

AC

Patent & Utility Model Concordance

MENU**SEARCH****NEWS****HELP**

Document Number list

	1	2	3	4	5
Application Number	59-281862(1984)				
Unexamined Publication Number	JP,61-012288,A(1986)				
Examined Publication Number					
Registration Number	JP,2648301,B				

Please choose a Kind code with Display Type.

Kind code Registration**Display Type**

All Pages



Best Available Copy

* NOTICES *

AC

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Background of invention This invention relates to production of the interesting protein by the eukaryotic cell. It is related with the vector for transformations containing the gene which is related more with the complementray DNA (accessory DNA) which raises a proteinic manifestation to a detail about the thing which was secreted from the eukaryotic cell culture by which the transformation was carried out with the gene which carries out the code of protein and the marker which can be chosen especially, and which obtain useful protein with high yield commercially, and carries out the code of the protein.

The next definition is offered in order to make an understanding of this invention easy. The following definition should attain to even extent from which it separated for a while from the semantics which is circulating by this technical field.

Magnification (amplification) means the process in which a cell produces gene duplication within those chromosomes DNA.

joint transformation (cotransformation) -- a cell -- ** -- an intermediary -- the process which carries out the transformation of the cell with one or more heterogeneous foreignness genes (one of them gives the phenotype which can be chosen to a cell) is meant.

A lower stream of a river (downstream) means the direction which goes to the direction of three ends of a nucleotide sequence.

A promoter (enhancer) is the nucleotide sequence which can reinforce the imprint of a gene regardless of the location of the nucleotide sequence over the true character of a gene, and a gene, or the directivity of the array.

A gene is a deoxyribonucleotide array which carries out the code of the target maturation protein. Probably, in this specification, a gene does not include an RNA-transcription start signal, a polyadenylation addition part, a promotor, or a side-face field (flanking region) like a promoter that is not translated.

Selector genes (selection gene) are genes which give phenotype to the cell which discovers a gene as detectable protein.

A selection factor (selection agent) is the conditions or matter which enables detection of the manifestation of selector genes.

Phenotype (phenotype) means many properties which the cell discovered with the genotype of a cell can observe.

A product gene (product gene) is a gene which carries out the code of the protein product which has a desirable property which is useful on a diagnosis or a therapy.

Genotype (genotype) means the genetic information included by intracellular as what is opposed to the manifestation observed as phenotype.

Association (ligation) means the process which forms a phosphodiester bond between 5' end of two DNA strands, and 3' end. This is attained by some enzyme-actuation including association of the flush end by T4 DNA ligase in which it was known well.

Directivity (orientation) means the sequence of the nucleotide in a DNA array. The opposite directivity of a DNA array is an opposite intermediary **** thing, when it compares about other arrays like criteria of DNA from which the array was acquired for the 5'-3' sequence of the array. The origin of replication of the vector including the imprint direction of other specific DNA arrays in the source of DNA or its array which can be reproduced is contained in this kind of reference point.

An imprint (transcription) means composition of RNA from DNA mold.

It means that a transformation (trans formation) changes the genotype of a cell when a cell incorporates foreign DNA. The transformation is temporary, or it is stable, and, in ***** and some cases, the cell detectable [with change of the phenotype of a cell] by which the transformation was carried out is called a transformant. A front transformed cell is called a mother cell.

A translation (translation) means composition of POPIPEPUCHIDO from messenger RNA. Generally, installation of DNA to an eukaryotic cell is the approach learned well, and can be attained by various kinds of standard methods. these -- protoplast fusion, the microinjection of DNA, chromosome transfection, a bacteriolysis, and a non-lytic virus vector -- [-- for example Mulligan's and others "Nature"(London) 277:108-114(1979)], Cell-cell fusion ["Proc.Nat.Acad.Sci."74:319-323 (1977) of Fournier and others], Use of the cell endocytosis ["Proc.Nat.Acad.Sci."74:1590-1594 (1977) of Bachetti and others] of lipid structure (U.S. Pat. No. 4394448) and DNA precipitate is included.

A cell can incorporate DNA temporarily, or the DNA is incorporated and can produce a stable cell lineage train according to terms and conditions. One approach for acquiring a stable cell lineage train inserts selector genes with DNA containing the target protein gene, and is holding the cell lineage train under a selection pressure. Anyway, it is desirable to find the approach of raising the manifestation of the protein from a cell by which the transformation was carried out.

Epitome of invention This invention offers the means which raises the manifestation of the foreign protein within an eukaryotic cell. The approach of raising the manifestation of a foreign protein within an eukaryotic cell according to this invention is ***** since DNA and the complementray DNA which carry out the code of the non-viral protein of a different kind are introduced in an eukaryotic cell, and the cell is cultivated and said protein is made to discover. This invention is offering the vector for transformations containing the complementray DNA for using it within an eukaryotic cell so that it may make non-viral protein of a different kind discover again. In a suitable embodiment, the gene which discovers the selectable phenotype which can be amplified is introduced in an eukaryotic cell, and the installation DNA which carries out the code of the target foreign protein, and magnification of a complementray DNA are promoted.

Detailed description of invention According to this invention, DNA (namely, product gene) which carries out the code of the protein of a complementray DNA and the purpose is introduced in an eukaryotic cell. A complementray DNA raises the manifestation of the protein to mean. For example, a complementray DNA can have other operations for making the effectiveness of an imprint or a translation increase, or raising the manifestation of the target protein.

According to this invention, a complementray DNA is a part of vector system for transformations. Before installation of DNA which carries out the code of the target foreign protein, it is introduced into intracellular installation, coincidence, or after installation. A complementray DNA is DNA which improves the stability of the product compounded by the cell lineage train by which the transformation was carried out, and raises magnification of the foreignness gene introduced in the cell lineage train, and increases the effectiveness of an imprint or a translation. A complementray DNA includes many functions recognized by the mother cell. In this way, a complementray DNA is a thing more than the mere carrier DNA before used in the transformation, or bulky [DNA].

One category of a complementray DNA consists of DNA which carries out the code of the translation activator. A translation activation gene produces protein or the short non-translating RNA product which acts on the messenger RNA for a product, and mutual so that the effectiveness of a translation may be raised. One example is the adenovirus DNA which carries out the code of the (VA) RNA which is related to a virus ["Cell"31:543-551 (1981) of Thimmappaya and others]. This DNA produces two matter (VA1 and VA2) of small not translating [RNA]. VA It is thought that the RNA product of DNA raises the translation from mRNA which contains the leader sequence by the uncertain approach with regards to 3 partial leader sequence of the main late promoter (major late promoter) of adenovirus for now. VA RNA raises the translation possibility of other initial adenovirus mRNA again ["Mol.Cell Bio."4:736-742 (1984) of Svensson and Akusjaru]. VA1 or VA2DNA is known well. It may be transfected, while direct coupling is carried out into a chain vector with the promotor (from the promotor who is a product gene preferably to the upstream, or from a polyadenylation region to a lower stream of a river) or it has not been combined by it to a product gene or selector genes.

VA The translation raised by RNA is the most dramatic when 3 partial reader structure of the anaphase adenovirus mRNA exists in the mRNA.

Another category of a complementray DNA contains the eukaryotic cell genome nature DNA from a mother cell. Although it is thought that this DNA includes the array which promotes the stability of the origin of replication or DNA, the mechanism of the ***** skirt is not known in the useful operation of this kind of DNA. This DNA can be obtained by cutting the genome nature DNA of a cell lineage train at random, or digesting by endonuclease. As for the genome nature complementray DNA, magnitude should consist of a fragment of about 50 to 5000 base pair. These fragments are combined from the promotor of the vector for metaplastm conversion by the limit part which a polyadenylation region to the upstream (from the promoter which can creep preferably to the upstream), or a lower stream of a river can use. In this way, these vectors become a thing suitable for a transformation, and a transformant is sorted out after this about the desirable property beyond one or it (for example, the stability of the product composition after gradual culture

of a transformant and/or high yield of a product).

The yield of the product from a transformant can improve by carrying out the transformation of the cell by the complementray DNA of one category named the transformer-***** transcriptional activator. This kind of DNA carries out the code of the protein or the protein derivative which stimulates an imprint. After fission of the number of predetermined in the cell in which they are called an indestructibility gene since they enable descendant formation which infinity followed, and one category of a transcriptional activator contains this kind of gene does not become extinct. Since these activators gather an imprint rate, it does not need to be combined in the same DNA strand as a product gene, and in this point, these differ from a promoter ["Cell"35:127-136 (1983) of Imperiale and others, "Cell"35:137-148 (1983) of Green and others]. ***** cloning of several sorts of transformer-***** transcriptional activators used by this invention is carried out by these the very thing known. Homo sapiens C-myc, an SV40 large-sized T antigen, a polyoma virus large-sized T antigen, and an adenovirus E1A gene are contained in the example studied most widely.

The product gene which can be used is essentially infinite. The gene which carries out the code of the protein, or the gene which carries out the code of the matter which can make by the reaction based on protein like enzyme inversion is suitable. or [that the gene which therefore carries out the code of the protein (for example, some enzymes from a prokaryotic cell or the lower source of an eukaryotic cell) which has a bad influence at a host cell to compounding a toxin or hydrolyzing host protein adds an antitoxin to a culture medium] -- or it can be used, being able to add a limit of choosing low manifestation level rather than it is carried out that it is the optimal. The gene of the protein in which activity is shown, or an enzyme is found out by intracellular [of higher animals, such as mammalian or a **** animal,]. Probably, the interesting gene which carries out the code of most protein for a therapy belongs to this category.

the example of a product gene -- blood coagulation nature or fibrinolysis nature protein (for example, an antihemophilic factor --) A tissue plasminogen activator, urokinase, and the clot-of-blood factor II, VII, IX, X or XIII, blood protein (for example, fibronectin or albumin), The protease inhibitor (for example, antithrombin III, alpha 1-antitrypsin, and 2 macroglobulins), hormone or regulatory protein (for example, lymphokine, such as erythropoietin and other T-cell active substances, --) They are a growth hormone and a platelet induction growth factor, an oncogene product, a cell surface antigen, immune proteins (for example, IgG, IgE, and IgM), complement, and the gene that carries out the code of the interesting protein on other commerce.

Vector for transformations Probably, generally the vector used for the transformation by this invention contains a complementray DNA and a product gene. Furthermore, probably, other elements, such as a 3' non-coding region usually described by a promoter, the promoter, the intron, the polyadenylation region, and the following, exist in the vector for transformations. When using selector genes, it can exist in the vector which is combined to the product gene in a vector, or contains the product gene, and another vector by which joint transformation is carried out.

selector genes -- three category: -- it is classified into the selector genes amplified possible [detection], dominant selector genes, and the dominant selector genes amplified possible [detection].

The selector genes amplified possible [detection] can detect magnification by exposing a host cell to a selection factor. The non-dominant gene amplified possible [detection] needs the mother cell sequence which generally lacks selector genes as genotype. as an example -- asparagine synthetase; -- the genes which carry out a code aspartate transcarbamylase [9:541 (1976) of Kemp and others]; adenylate deaminase ["Mol and Cell Biol." 2(11):1346-1353 (1982) of DeBatisse and others]; adenosine deaminase [J.B.C.258:15185 (1983) of Yeung and others]; mouse dihydrofolate reductase (DHFR) and a mouse thymidine kinase (TK), and (with a deficit promotor) are contained.

Dominant selector genes are discovered in a transformant irrespective of the genotype of a mother cell. It is because most dominant selector genes are very effective for not being amplified possible [detection], because the phenotype processing a selection factor, so it is difficult to amplify the cell lineage train which amplified the gene, and to identify in an inside **** cell lineage train. The example of this type of dominant selector genes is a xanthin-guanine. They are the genes which carry out the code of the enzyme of prokaryon animals, such as a phospho RIBOKI sill transferase ["Proc.Nat.Acad.Sci."78(4):2072-2076 (1981) of Mulligan and others], and aminoglycoside 3'-phosphotransferase ["J.Mol.Biol."150:1-14 (1981) of Colbere-Garapin and others].

Some dominant selector genes are amplified possible [detection] again. The gene which carries out the code of the enzyme (for example, unique esterase) which naturally produces a fluorescence product or a coloring product from the variation DHFR gene and a cell surface marker like an HLA antigen which were indicated by "Somatic Cell Genet"4:499-508 (1982) of Haber and others and fluorescence Hara known for this technical field, or the quality of a coloring matter germ is contained in a suitable example.

It is desirable to use the dominant selector genes amplified possible [detection] in this invention. If it can convert into the gene therefore amplified possible [detection] by the suitable mutation within the gene, he should understand the dominant selector genes in some.

As for a selection factor, it is desirable that it is what controls cell proliferation under un-existing [of selector genes]. In this way, the revertant of the long term culture which lacks selector genes (and probably ***** gene), or does not discover the selector genes any longer does not increase the ensemble too much. However, probably, in commercial production of the protein product for the therapy purpose, it will be desirable to avoid use of cytotoxin and to simplify the purification process of the product. so, the growth which cannot be used when, as for desirable selector genes, a transformant lacks selector genes -- ** -- a nutrient with an indispensable intermediary may be made to use it for a transformant. There is a TK gene previously described as one example.

It should care about selector genes being product genes again and obtaining them. For example, to harvest the product of the selector genes for using it as a therapy agent or a diagnostic agent is desired. A product gene can function as selector genes, if the environment of a transformant is changed and the product can give some selection profits to a transformant. For example, a product gene can produce the enzyme to which act on the indispensable substrate which cannot be used and the indispensable substrate (for example, essential nutrient) is made to emit by other approaches in a cell culture medium.

This kind of array will not usually be accompanied so that it may state below, although the

selector genes and the product gene which are used here may accompany all or a part of side-face array into which those wild types are not translated. In the case of a chain vector, especially the useful result of product yield is obtained by approaching the field of a parenthesis in the upstream from the translation field of selector genes, and locating a product gene. This means being cut therefore by the deletion which passes through the oligonucleotide priming of M13 which most is therefore cut by suitable restriction endonuclease, or is shown in other places of this specification, though 5' untranslation region found out by the upstream all generally does not come out from 3' untranslation region found out down-stream from a wild type product gene, and wild type selector genes. Consequently, direct coupling of both genes is carried out, without inserting a promotor between a product gene and selector genes.

the gene used here -- general -- the structure of a mature product, stability, and/or secretion -- ** -- an intermediary -- probably, the wild type translation array which carries out the code of the desirable pre pro-polypeptide (for example, secretion reader) is included. However, when the translation leader sequence of a wild type does not act appropriately within a transformant, therefore, this kind of pre pro array may be permuted by other pre pro arrays which deletion is carried out before the nest to a vector, and the joint transformation of a subsequent host cell, or act appropriately within a vector.

It is not important that the gene contained in a vector or a vector is generally interrupted for the intron, as long as the messenger RNA as which the messenger RNA imprint object from a vector is cut down suitable for a transformant therefore, and is translated into the leader sequence of maturation protein and the purpose is produced. This is the case of the intron found out by the gene of the predetermined Tomomasa Taka nucleus cell in which processing should be carried out by other Tomomasa Taka nucleus cells. Considerable reduction of possibility of the intron not existing at all, but waiting and starting after a ***** imprint (post-transcriptional splicing) will be carried out since the gene of most which is used here is a cDNA reverse transcription object.

As for the code chain for selector genes and a product gene, in the case of a chain vector, it is desirable to be joined by to couple the halt codon of a product gene directly to the initiation codon of selector genes therefore. Apart from this, both these genes are combined through the oligodeoxyribonucleotide pons which is rich in guanine deoxyribonucleotide (G) and cytosine deoxyribonucleotide (C). It is better not to include a termination codon, an indication codon, and a palindrome structure (palindrome), since this pons reduces the formation possibility of an APIN loop formation to RNA.

The vocabulary a "product gene" and "selector genes" does not mean that only only each one gene or each single gene copy is used within a vector. In the first place, predetermined selection phenotype may need composition of one or more separate protein. Probably, in this case, the selector genes of each protein exist in the vector combined with none of a product gene or other selector genes by covalent bond. Moreover, each selector genes will be combined to a product gene as stated previously, or so that it may be indicated by U.S. Pat. No. 4399216. Probably, it will not be desirable to use one or more selector genes, when other selector genes of which give [each selector genes] the selection phenotype for the same selection factor independently.

It may be desirable to carry out the transformation of the separate product gene using

included one or the vector beyond it. Especially the separate product gene that carries out the code of the protein which has a useful operation mutually leans interest. For example, the coincidence manifestation of the protein which stabilizes other protein products, or the protein which makes a part of multiplex protein system which has an activity operation biologically can be carried out.

furthermore, both selector genes, and product both [either or] are repeated within one or the vector beyond it -- you may have -- namely, multiplex -- generally it may exist by the copy of a tandem (serial). In such a case, as for the repeated gene, it is advantageous to include all the RNA processing which exists in the vector which includes only an only one gene copy respectively, and transcriptional control arrays.

A vector can contain a promoter again. Although promoters differ on a promotor and a functional target, it is thought that it ***** in cooperation with a promotor. Although those functions in cell level are not understood enough, those unique properties are in the capacity which is made to activate an imprint regardless of a location or directivity, and is reinforced again. A promotor needs to exist in the upstream of a gene and, on the other hand, the promoter may exist in the upstream of 5', i.e., direction, from a polyadenylation region from the gene between the gene in a gene, and a polyadenylation region as the intron from a promotor in the lower stream of a river of 3', i.e., the direction. The inversion promoter is functional although an inversion promotor is not functional. A promoter exerts effectiveness on a promotor, only when it is SHISU *****, i.e., they exist in the same DNA molecule. Please refer to "Cell"33:313-314 (1983) of Khoury and others about general introduction of a promoter.

A suitable promoter is obtained from the simian virus 40, a polyoma virus, a bovine papilloma virus, a retrovirus, or an animal virus like adenovirus. It is better for a promoter to be a thing from the virus which a host cell permits, i.e., the virus usually infected with the cell of a host mold, ideally. A viral promoter can be easily obtained from the viruses which can come to hand openly. For example, the promoter field of the Rous sarcoma virus or several sorts of viruses like the simian virus 40 is known well. Please refer to "Cell"33:705-716 (1983) of Luciw and others. It is an idiomatic chemistry means to cut off these fields based on the restriction map the virus in question was announced officially, saying, to embellish those parts if needed, and to connect the promoter in the vector of a product gene or selector genes. For example, please refer to Kaufman's and others Mol.Cell Biol.2 1304-1319 page (1982). As an option, a promoter is compoundable from array data. This could actually be attained, since the magnitude (generally about 150 or less base pairs) of a viral promoter is fully small.

It can dissociate over the whole vector by the part which is a tandem die (when using the SV40 viral promoter which can be found out in a nature), or was discussed previously, and a promoter can be made to repeat in a vector. the gene which a promoter has under the effect in the source of a wild type preferably -- being related -- it -- with, the same directivity as the directivity which was -- a product gene and/or selector genes -- being related. It is suitable for a promoter to be located in the upstream from all the promoters that exist in a vector. In order to use the promoter with which plurality differs and for a promoter to be helpful in the case of a transformation, it does not need to be combined to a product gene or selector genes. As for a promoter, in a non-chain vector system, existing in the vector containing a product

gene is desirable. This will increase possibility that a product gene and selector genes will be physically combined within a coincidence transformant. In this mold, the transformant of about 1 to 100 times or more can be obtained according to the promotor used for the imprint of selector genes to the transformation DNA of the specified quantity.

the side-face array (for example, about the origin of replication of a virus, a promotor component with relation like a TATA box, and the cap section or imprint primer array) which can find out a promoter by the wild type environment -- each -- it is not necessary to contain. However, it is more convenient to incorporate all or a part of these arrays, when the restriction enzyme part which makes deletion of these arrays possible does not exist.

Moreover, probably, it will be still more convenient to use a DNA fragment including both promoters under wild type control of a promoter and its promoter.

Promoter and promoter-promoterregion can be chosen from an eukaryotic cell rather than a virus. As for these, it is desirable that it is a promoter relevant to the gene which produces the protein of the big amount of configurations by source intracellular. They had it found out to produce the product of high yield similarly from genes other than the gene usually controlled in a wild type environment. The host cells which are going to carry out a transformation are the suitably same somatic line as the cell from which the promoter was obtained, and a germ line. For example, the field (immunoglobulin promoter) which activates or promotes the immunoglobulin gene in the Jk-Ck intron is introduced into the upstream or the lower stream of a river of a product gene, and this structure is introduced with selector genes into a myeloma cell sequence. Refer to "Cell"33:717-728 (1983) of Gillies and others for the detail about this promoter. As for an immunoglobulin promoter, it is advantageous to be used in the vector of the schedule inserted into the myeloma cell for making a protein product produce.

As [combine / by both a product gene and selector genes / to a promotor / it / under a promotor's transcriptional control] (however, the case of the chain vector described previously is removed) A promoter is a wild type promoter for the gene in question, and it may be combined from other genes to a promoter within the transformed cell sequence from the eukaryotic cell sequence of others [gene], or a procaryote virus also with sufficient *****. Although the promoter should therefore be clearly recognized by the host who is going to do a transformation without the accidental recombination by the promoter in a transformed cell, I do not think that a promoter's selection is restrictive in the case of others. It is combined to 5' non-translating reader, and especially a desirable promoter is activated by the factor or conditions (for example, [the impact by the auxiliary gene product (an imprint object and polypeptide), the heavy metal ion, and heat or virus infection]) of foreignness in imprint or in translation. product gene expression -- ** -- an intermediary -- a suitable promoter is the main late promoter of adenovirus with 3 partial reader.

A vector system does not need to contain a promoter, when a promoter (for example, promoter for mouse alpha globin) unrelated to a promoter is chosen. However, the vector which contains a promoter and the powerful promoter (for example, adenovirus main late promoter) of a promoter-dependency rather than the powerful promoter of this kind of promoter-non-dependency is used. The furnace as the initial promoter of SV40 with the powerful promoter same under the controlled conditions brings about more imprint objects than it.

The element of others with it better [to exist in a vector] is a polyadenylation region. Adenine ribonucleotide adds this to ***** and its gene in the DNA array located down-stream from the translation field of a gene, and it forms the tail of poly adenylate in 3' end of messenger RNA. Polyadenylation is important for stabilizing messenger RNA to the phenomenon of reducing decomposition of a cell, the level of messenger RNA, and the level of a protein product.

The polyadenylation region of an eukaryotic cell is known well. : to which a consensus (consensus) array exists between eukaryotic cell genes -- 5'-AAUAAA-3' of a hexa nucleotide is found out from one point of RNA which polyadenylation leaves at the place of 11 -30 nucleotide. the report with which the DNA array containing a polyadenylation region was announced -- therefore, it can obtain from a virus. The example of a polyadenylation array is acquired from an anaphase or an initial field gene of mouse beta globin and the simian virus 40 etc. The polyadenylation region of a virus is more desirable. Since these arrays are known, it can compound by in vitro one and can be made to join together to a vector by the common use approach.

The polyadenylation field should be located down-stream from the product gene within the chain or the non-chain vector. In a non-chain vector, it is combined down-stream by the case from selector genes. The array which separates a polyadenylation region from a translation halt codon is a non-translating DNA field preferably like the eukaryotic cell gene which is not promoted. As for an oligonucleotide, it is desirable to extend a distance (about 1000 or less bases) considerable from a halt codon to a polyadenylation region. This 3' non-translating nucleotide sequence makes the yield of a product increase generally.

Although a vector finishes from an about 30 base pair lower stream of a river from a consensus sequence, it is advantageous to hold 3' array which can be found out down-stream from a polyadenylation region within a wild type environment. Generally these arrays are about 200 to 600 base pair ***** to the lower stream of a river from a polyadenylation region.

It is ** and ** which the yield of a product will increase if the intron exists in un-translating [of a vector], and an imprint part. This kind of intron may be obtained from other sources other than a host cell or a gene source. For example, 3' splice site from the immunoglobulin gene inserted instead of a part of Normal intron of this imprint object into the untranslation region of an adenovirus main anaphase imprint object can bring about the increment in yield of a product.

The cell therefore transfected by the combination of a transcriptional activator, a translation activator and a powerful promotor or a promotor, and a promoter offers the product composition raised most. A cascade operation will be produced from this imprint and a translation activator-transformed cell.

A vector is the supercoil-like double stranded ring-like structure suitably. This is a form with which a vector is obtained from a standard procaryote cloning process (a vector is therefore made by this approach). However, the vector may be line-ized, namely, accompanies other processes like association to a genome nature complementray DNA, and may be cut in covalent bond at one certain point.

The next table is the typical example of the suitable vector system for transformations.

表

1

1. $\boxed{E_n - VP - Pd - S - p(A) - R}$
2. $\boxed{E_n - VP - Pd - p(A) - R}$; $\boxed{VP - S - p(A) - R}$
3. $GF - E_n - VP - Pd - p(A) - R - GF$; $GF - S - p(A) - R - GF$
4. $GF - EP - Pd - p(A) - GF$; $\boxed{EP - S - p(A) - R}$
5. $\boxed{VP - TTA - p(A) - R}$; $\boxed{E_n - VP - Pd - p(A) - R}$, $\boxed{EP - S - p(A) - R}$
6. $\boxed{VP - TTA - p(A) - R}$; $\boxed{E_n - VP - Pd - p(A)}$, $\boxed{EP - S - p(A)}$
7. $\boxed{VP - TLA - p(A) - R}$; $GF - TTA - E_n - VP - Pd - p(A) - GF$; $\boxed{EP - S - p(A) - R}$
8. $\boxed{E_n - VP - I - Pd - p(A) - R}$; $\boxed{VP - S - p(A) - R}$;
9. $\boxed{TLA - p(A) - R}$; $\boxed{VP - TTA - p(A) - R}$; $\boxed{E_n - VP - I - Pd - p(A) - R}$; $\boxed{EP - S - R}$,
10. $\boxed{E_n - VP - I - Pd - S - TLA - p(A) - R}$
11. $\boxed{EP - Pd - B - S - E_n - p(A) - R}$; $\boxed{VP - TLA - p(A) - R}$
12. $\boxed{E_n - VP - Pd_1 - Pd_2 - S - p(A) - R}$
13. $\boxed{TLA - VP - Pd - S - p(A) - R}$
14. $GF - TLA - VP - TTA - p(A) - R - GF - E_n - VP - Pd - I - p(A) - R - GF$
15. $\boxed{TLA - R}$; $\boxed{VP - I - Pd - p(A) - R}$; $\boxed{E_n - S - p(A) - R}$

EP=真核宿主細胞によつて認識される非ウイルスプロモーター

VP=真核宿主細胞によつて認識される非ウイルスプロモーター

TTA=トランス-作働性転写活性化因子

E_n =促進因子

TLA=翻訳活性化因子

$p(A)$ =ポリアデニレーション部位

Pd=生産物遺伝子

S=選択遺伝子

B=オリゴヌクレオチド橋

—=ホスホジエステル結合

;=非結合ベクター成分を表わす

GF=真核細胞ゲノム性断片

I=外来性イントロン

R=複製成分(合成ベクターからのプラスミドまたはバクテリオファージ残部)

$\boxed{\quad}$ =プラスミドのような環状DNA配列を示す。

Vector composition The chain vector which does not have an oligonucleotide array among these with an oligonucleotide array short between a product gene and selector genes can be made by several sorts of approaches. When the translation halt codon of a product gene is

adjoined or a limit part does not exist in the nearest place of a lower stream of a river from there, a product gene is cut by the limit part of the upstream of a wild type translation halt codon, and the codon is combined to a selector-genes fragment using a synthetic binder after that. The another creation approach of such a vector is carrying out deletion of the array which is between a product gene and selector genes using a bridge formation nucleotide probe and which is not desirable. As another approach, a synthetic termination codon will be combined to convenient 3' end, when the carboxy end amino acid of a protein product is not required for biological activity. Since to compound the same possible protein product as what can be found out in a nature is desired, it cannot be said to be a suitable embodiment to use a gene fragment here.

5' untranslation region which is in the side face of selector genes within a wild type environment can be removed by the same approach as the approach which described the product gene previously, and this is performed to deletion and coincidence from a product gene, as shown in an example 3. However, the protein therefore discovered by selector genes or its derivative does not need to be the same as that of a wild type, for example, it is activity more to a growth limiting substrate, or its ***** is more better than wild type protein at resistance to a toxin. As for selector genes, in a chain vector, it is desirable that it is under control of the promotor of a product gene. This will be useful to stabilizing the manifestation of the genotype of a cell, and a protein product, since it cannot be survived from a selection factor when a recombination phenomenon with a transformant does not have a cell lacking in a product gene. Although it was found out that it is opposite in the case of a non-chain vector, the same promotor can be used for both selector genes and a product gene also here. In addition, the vector shown here is compoundable using the technique well known to those who became skilled in this technical field. Vector components, such as a product gene, selector genes, a promoter, a promoter, and a complementray DNA (for example, a transformer-***** transcriptional activator, a translation activator, and a like), are also compoundable, as it can obtain from the source of nature and being stated previously. When fundamentally found out in DNA which a vector component can obtain in large quantities (for example, a component like a virus function), Moreover, when they are compoundable (for example, polyadenylation region), A lot of vectors can cultivate the source of a living thing, can digest the DNA by suitable endonuclease, can separate the DNA fragment, can identify DNA containing an interesting element, and can obtain it by collecting the DNA using the approach which this technical field is sufficient as and was learned. Generally, the vector for transformations is combined after that to a little ***** and composition vector like the plasmid of a procaryote, or phage reproduced autonomously. In many cases, pBR322 plasmid can be used. Please refer to Kaufman's and others above-mentioned reference (1982). The big vector for transformations may need the synthetic high vector of stowage like cosmid (cosmid; vector reproduced as a plasmid when transfected to an acceptance host although phage DNA is enclosed in phage capsid).

A synthetic vector is the common use approach, for example, therefore, it is used for the duplicate of the transfection of an acceptance procaryote, and the synthetic vector to a high copy number, recovery of the synthetic vector by lysis, and separation of the synthetic vector from the cell fragment by the approach which this technical field is sufficient as and was learned cloning the vector for transformations.

The obtained synthetic vector is directly transfected into an eukaryotic cell, or is isolated from a synthetic vector by recovery of the endonuclease digestion with the suitable vector for transformations, the separation by molecular weight, and the vector for transformations. Isolation of the vector for transformations is unnecessary unless the remainder of a synthetic vector has a bad influence on magnification of an eukaryotic cell gene, an imprint, or a translation. for example, the suitable synthetic vector used here -- the mutant of a plasmid pSR322 -- it is -- this -- the eukaryotic cell in a plasmid pSR322 -- ** -- an intermediary -- deletion of the harmful array is carried out. Please refer to Lusky's and others Nature 293:79-81 (1981). Use of this mutant removed the need of carrying out deletion of the remainder of a plasmid before a transformation.

Transformation In which eukaryotic cell containing the protoplast of yeast, the cells which are going to carry out a transformation are cells other than a fungus cell suitably, although ***** is also good. It is a primitive transplantation object (a comparatively undifferentiated cell like a stem cell is included), and indestructibility, and/or the cell lineage train by which the transformation was carried out are suitable. The cell which is going to carry out especially a transformation has a desirable animal cell, and an animal cell also contains the cell of the Homo sapiens origin here. When the selector genes are used, a cell does not need to lose the selector genes as genotype, as long as it acts on dominant.

In a certain embodiment, the stable cell lineage train by which the transformation was carried out is not needed. In such a case, it can depend for the suitable vector for transformations on temporary installation of DNA into a mammalian cell [Cell 27:279-288 (1981) of P.Mellon, V.Parker, Y. Gluzman, and T.Manias]. In order to isolate the target transformant, it is not required that the foreignness gene in which all the ensemble's cells discover the target protein product should be included in stability. It is possible to introduce a foreignness gene temporarily to the sub ensemble of a cell which discovers the product aimed at obtaining a cotton intermediary in several days. Since the marker which can therefore be chosen as the transfection and the manifestation system of DNA by this invention is not needed in the vector for transformations, a foreignness gene is lost in the case of the cell proliferation over one - two weeks. However, it is found out and detected two - three days after the transfection of a suitable mammalian cell that the target product was compounded.

In this way, the host-vector system for cloning the gene of mammalian protein is based on the development of a valve flow coefficient-1 ape cell lineage train by which the transformation was carried out by the origin-of-replication-deficit SV40 DNA molecule [Cell 23:175-182 (1981) of Y.Gluzman]. SV40 is a small DNA oncogenic virus reproduced in lysis by intracellular [of an ape]. SV40 will carry out the transformation of the cell of an ape, when there is no replication of DNA. Although ape valve flow coefficient-1 cell (COS is called) containing deficit SV40DNA by which the transformation was carried out does not include the perfect copy of an SV40 genome, a large-sized T antigen is produced with a high level, and SV40 replication of DNA is permitted. They support a duplicate with a plasmid efficiently recently containing the origin of replication of SV40 which has the deletion of an initial field again, and SV40 [PNAS 77:6491-6495 (1980) of R.M.Myers and R.Tjian]. So, this system offers a means to make the foreign DNA (a protein gene and complementray DNA) transfected through SV40 agency replication of DNA amplify in order to make the level of the protein discovered from foreign DNA, and mRNA increase.

In other embodiments, a cell is the immortalized stable mammalian cell sequence. The cell lineage train in which stabilizing and incorporating selector genes in Chromosome DNA is known is suitable, for example, is a Chinese hamster ovary cell (CHO) cell lineage train. In addition, a HIRA (Hela) cell, a COS ape cell, a melanoma cell lineage train [for example, a bow S (Bowes) cell lineage train], a mouse L cell, mouse fibroblast, a mouse NIH 3T3 cell, and a similar cell are useful.

The transformation in the non-chain DNA is gradually performed to coincidence. The method of promoting incorporation of DNA by the cell is learned. Although the microinjection of the vector into a nucleus produces the highest transformation effectiveness, probably, also generally it will be convenient suddenly to expose DNA of the form of calcium phosphate sediment to a mother cell. The frequency of the transformant which discovers a product is further raised by carrying out a transformation using a product gene (about 10:1 or more than it) with a superfluous mol to selector genes.

A selection transformant is screened after that about association of the product gene in those chromosomes, or a manifestation of product itself. The former is attained using the Southern (Southern) blot analysis, and, therefore, the latter is attained by standard immunoassay or enzyme assay.

Once a transformant is identified, the process which amplifies product gene expression further will be performed by carrying out subcloning to the bottom of existence of the selector genes of a constant rate or augend. general -- this -- the cell population of a transformant -- taking out -- and (a) -- one or the cell beyond it which chose from the ensemble one or the cell beyond it which discovers a product, and made; (b) selection by the approach which was excellent with the case where it compares with other cells of the cell population ; which chooses further from the ensemble one or the cell beyond it which discovers a product by the approach which was excellent with the case where cultivated to the following cell population under the conditions set up so that it might therefore be chosen as the change in gene expression, and it compares with other cells of the ensemble from; and the (c) process (b) -- it is accompanied by things. A process (b) is advantageously carried out by using many clones from a process (a). This approach is indicated in detail by the United States patent application No. (quoted by reference here) 565627 under connection on December 17, 1983.

The following example is not offered in order to illustrate this invention further, and it does not limit a claim. The temperature used in an example is **.

Example One cell culture The SV40 transformation COS ape cell (clone M6) received offer from M.Horowitz (Horowitz et al., J.Mol.App.Genet.2,147-9 page (1983)). Adenovirus 2 received offer from P.Sharp. Adenovirus infection was carried out by making 20 pfu/cell during 90 minutes absorb at 37 degrees C. The cell was incubated at 37 degrees C after washing for 18 hours. Cell ***** remarkable to this time amount was observed.

DNA transfection added and carried out chloroquine processing (Luthman and Magnusson, Nuc.Acids Res, 11, 1295 - 1308 pages (1983)) to the approach indicated by Proc.Natl.Acad.Sci., 78, and 7575 - 8 pages (1981) by Sompayrac and Danna. A cell is washed by the serum free medium and it incubates at 37 degrees for 12 hours in the Dulbecco amelioration Eagle culture medium containing the DEAE dextran (NW5000.000Pharmacia and 250mg/(ml)) and the 2microg [/ml] plasmid DNA which were

added to 0.1M tris of pH7.3. A cell is washed by the serum free medium after an incubation, and it processes at 37 degrees with the 0.1mM chloroquine in a blood serum content culture medium for 2 hours. A cell continues, carries out seeding to a culture medium, and specified and carries out time amount incubation.

Plasmid configuration In order to analyze whether the adenovirus specific interaction factor has influenced Adenovirus MLP, a series of DHFRcDNA genes are constituted and they are shown in drawing 1 (a)-1(e). pAdD26SVpA (3) contains the mouse DHFRcDNA under control of the adenovirus MLP including 5' splice site from the 1st reader and adenovirus late mRNA. The splice of this 5' splice site is appropriately carried out to 3' splice site introduced from a mouse immunoglobulin gene (Kaufman and Sharp, Mol.Cell Biol., 2, 1304 - 19 pages (1982)). The initial polyadenylation signal of SV40 exists in 3' end of a DHFR coding region. A cDNA gene lacks an array (Lusky et al., Nature(London);293, 79 - 81 pages (1981)) harmful to the duplicate of a mammals cell, and it carries out a clone into the pBR322 derivative (pSV0d) containing the SV40 origin or a duplicate object (Mellon et al.).

Plasmid pAdD26SVpA (3) (drawing 1 (a)) and pCVSVL (drawing 1 (b)) are already indicated (Kaufman and Sharp, the above-mentioned reference). pCVSVL2 is the same as that of pCVSVL except for the point containing the duplicate SV40Ava II D fragmentation introduced by addition of a XhoI linker, and insertion to XhoI (15.83m.u.) of the adenovirus MLP upstream. Orientation also of both Ava II D fragmentation is carried out as the SV40 late promoter is carrying out the same orientation like Ad2MLP.

Although pCVSVL2 is guided from pAdD26SVpA (3), it lacks the SV40 origin object from pSV0d, and it contains an SV40 enhancer and the origin of a duplicate for the upstream of Adenovirus MLP. pD20 (drawing 1 (c)) and pD17 (drawing 1 (d)) are the same as that of pAd26SVpA (3) and (drawing 1 (a)), if insertion of the 138bpDNA array (Zain et al., Cell, 16,851 - 61 pages (1979)) which carries out the code of the adenovirus 2nd guided from the cDNA clone for adenovirus fiber protein and the two 3rd thirds of the readers is removed. pD20 includes the 138bp field inserted in 5' splice site in the direction of the right to the Pvu II part of 8bp(s)5'. So, pD20 contains 8bp(s) from the 1st anaphase reader to 5' splice site including 1st 170bp from the late mRNA which carried out the code of the two perfect 1st, 2nd, and 3rd thirdss of the readers and which carried out the splice. pD17 (drawing 1 (d)) contains 138bp fragmentation in the opposite sense. pD61 (drawing 1 (e)) is the same as that of pCVSVL2 except for the point containing the 2nd and 3rd leader sequences which exist in pD20 (drawing 1 (c)).

In order to obtain pD17, and pD20 and pJAW43 (the Zain aforementioned reference), DNA is digested by XhoI, and it processes by the Klenow fragmentation of DNA polymerase 1, and digests by Pvu II after that. 138bp fragmentation is isolated and it connects with pAdD26SVpA (3) beforehand digested by Pvu II. DNA is screened by the 138 bp XhoI-Pvu II fragmentation from pJAW43 which imported and carried out the radioactive indicator to Escherichia coli HB ones 101. DNA is adjusted from the clone which the positivity hybridized and the acrylamide gel electrophoresis after digestion examines the sense by Pvu II and Hind III. In bD20, in the same direction, pD17 contains the fragmentation for 138bp fragmentation with the reverse sense to the imprint direction of Adenovirus MLP. It inserts in fragmentation from big pD20 which digested completely the EcoR1-XhoI part 1 [about]

from pCVSVL, and 1KB fragmentation by EcoR1 and XhoI, and pD61 is constituted. The generated plasmid pD61 carries out adenovirus promotor content with the reader of an SV40 enhancer and three parts.

These recombination objects are used for research of the adenovirus factor which affects such cDNA gene expression. The adenovirus superinfection of DNA transfection and a COS ape cell is included in an experiment process. The cell which transfected is infected by adenovirus 36 hours after DNA transfection, and it is left for 18 hours and incubates. Then, the indicator of the cell is carried out by 35S methionine for 1 hour, and DHFR composition is analyzed by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis. It is shown that both AdD26SVpA (3) and pCVSVL2 can carry out DHFR composition of the result as compared with the sample which carried out fake transfection. It is possible to detect the ape DHFR which moved immediately onto Mouse DHFR in the COS cell which carried out fake transfection.

Compared with a COS cell, what difference is also observed between two plasmids by the transformation of a CHO DHFR cell in the DHFR manifestation from pCVSVL2 and pCVSVL, and it is inside ****. Furthermore, the superinfection by adenovirus is also almost **** in **** about effectiveness to the DHFR composition from pAdD26SVpA (3) or pCVSVL2. However, the manifestation from pCVSVL2 is twice [more than] the pAdD26SVpA (3), and is *****. This is the result of introducing an SV40 enhancer into the upstream of Adenovirus MLP in pCVSVL2. It was observed that a plasmid (pD20, pH17, and pD61) including the reader insertion of 138bp(s) from the reader divided into three of the adenovirus which carried out the splice also compounds DHFR. Furthermore, both pD20 and pD61 react to adenovirus infection by DHFR composition increasing three to 10 times in a separate experiment. The expression from pD17 which contains the reader segment divided into hard flow three of 138bp(s) on the contrary is not influenced by the adenovirus superinfection. It has suggested that these results react to adenovirus infection in the format for which the array in the 2nd [which was divided into three] and 3rd reader segments depended on the direction.

In order to determine whether mRNA level is influenced by adenovirus infection, 3' S1 mapping was carried out as indicated by Mol.Cell Biol.2 1304-1319 (1982) by Kaufman and others. 3' end indicator DNA PUROGU is compounded, and is hybridized with all RNA isolated from the COS ape cell which carried out transfection and an adenovirus superinfection. In plasmids pCVSVL2, pD20, and pD61, single 550 base-pair fragmentation is observed and it corresponds to mRNA polyadenylated by the SV40 polyadenylation part. pD20 lacking in an SV40 enhancer shows twice [about] as many lower DHFR specific mRNA as this as compared with a plasmid with an SV40 enhancer. Change of DHFRmRNA level is not accepted in an adenovirus superinfection from a cDNA gene ***** therefore, either. It is shown that the increment in the DHFR composition by which this thing was observed by the adenovirus superinfection is not what is depended on the rise of DHFRmRNA level. The increment in the DHFR composition by the adenovirus superinfection is as a result of the translation effectiveness which increased.

Example 2 He is Homo sapiens in order to analyze the effectiveness in the translation of VA RNA. The new group (drawing 1 (a) -2 (d)) of the plasmid which discovers gamma interferon was constituted. Homo sapiens who did the clone from mRNA isolated from the

Homo sapiens peripheral blood liquid lymphocyte by the-oligo dG-oligo dC tailing method (Maniatis et al.) cDNA which is carrying out the code of the gamma interferon received offer from Dr. S.Clark (Genetic Institute). Pst1 clone which is carrying out the code of the gamma interferon vanished Pst I part 3' of an SV40 polyadenylation signal beforehand. It inserts in the Pst I part of pCVSVL2 derivative. Plasmid p(gamma IF) D-6 (drawing 2 (a)) to produce contains 3' of 3' splice site for 5' of gamma interferon coding region DHFRcDNA, and a mRNA ** student. In order to obtain the same plasmid with the reader divided into three, both p(gamma IF) D-6 and pD61 were digested by Sall and Egl II. Sall -- each plasmid -- the inside of the tetracycline resistance gene of pBR322 -- once -- digesting -- Bgl II -- each plasmid -- 3' splice site from an immunoglobulin gene -- 5' is digested once surely. It is used for connecting the gamma IF content fragmentation from p(gamma IF) D-6 with the fragmentation pD61 including 3 partial reader, and DNA carrying out the transformation of Escherichia coli HB one 101 to tetracycline resistance continuously. Although pL58 (drawing 2 (b)) contains the reader divided into three of ADEUIRUSU, it is the same as that of p(gamma IF) D-6 in respect of others.

An adenovirus UIRUMU VA gene is isolated from Hind III Ad2B fragmentation, and is introduced into pL58. The clone of the Hind III B fragmentation (17.1mu-31.7mu) of adenovirus is beforehand carried out into pBR322, and it combines the Hind III part of ***** 31.7mu with the EcoR I part of pBR322. This plasmid is digested by Hpa I (28.0mu), and an EcoR I linker is added. 1.4KB band is isolated after EcoR I digestion, and a clone is carried out all over the EcoR I part of pL58. PQ2 (drawing 2 (c)) is imprinted in the direction contrary to Adenovirus MLP, although VA gene exists in a vector. VA gene of pQ3 (drawing 2 (d)) is the same as that of pQ2 except for the point which is reverse directivity.

Gamma Interferon Gamma in turf en assay is carried out by measuring protection from cell ***** of the vesicle stomatitis virus to CCL54 cell (the ATCC number CCL 54, passage number 24), or the encephalomyocarditis virus (Stewart, W.E.II, an interferon system, Springer, Berlin, 1979). The TEMMA interferon unit was expressed to the NIH alpha interferon reference standard. Chloramphenicol acetyltransferase was measured from the cell extract by the approach indicated by Mol.Cell Biol., 2, and 1044-1051 (1982) by Corman and others.

The manifestation of gamma interferon enables assay with the sufficient sensibility of the quantitive effectiveness of VA RNA. p-gamma IF-6 and pL58 are the same as that of pD20 and pD61 except for the point that the gamma interferon cDNA is inserted in 3' splice site and the pst I part between DHFRcDNA(s) with suitable directivity. Finally, pQ2 and pQ3 are the same as that of pL58 except for the point that the adenovirus VA gene (adenovirus map units 28.02 and 31.00) is inserted in the EcoR I part in both directions.

Transformation in a COS cell Plasmids pQ2, pQ3, and pL58 and p-gamma IF-6 transfect a COS cell respectively (table 1A). You present assay with the sample of a 36 hours after conditional-culture medium, and make it one of the plates of two duplexes infected by adenovirus. A 20 hours after [infection] sample authorizes gamma IF activity again.

p-(gamma IF) D-6 showed low activity and an adenovirus superinfection also only went up slightly. 58 showed one several times the activity of this, and pLp6 showed the increment it is twice whose gamma IF activity of this by infection of adenovirus. ***** in which both

pQ2 and pQ3 have the gamma IF activity (50 to 70 times p(gamma IF) D-6) of a high level without an adenovirus superinfection intentionally on the contrary. Gamma IF activity decreased by the adenovirus superinfection. VA In order to determine whether carry the increment in the manifestation whose RNA is a gamma in turf en, a plasmid pQ2 and p(gamma IF) D-6 were respectively mixed by pSV0d or pVASV0d (derivative of pSV0d containing an adenovirus VA gene), and the ratio of 1:1, and the COS cell was transfected. 48 hours after carrying out transfection, gamma IF assay was presented with the sample. When p(gamma IF) D-6 carried out ** transfection with pVSV0d, they showed the 2 to 3 times as much increment as activity. By contrast, pL58 showed the increment in 10 or more times with ** transfection with pVASV0d. Finally, when pQ2 containing VA gene carries out ** transfection to pVASV0d, it has high gamma IF. These results make easy the manifestation from mRNA containing the large majority of the reader with which existence of VA gene in a transformer was divided into three from adenovirus late mRNA. Reduction of the gamma IF activity by pQ3 superinfection seen in Table 1 will be based on contention of the toxic effectiveness or the adenovirus late mRNA by the adenovirus infection to a cell metabolic turnover, and the imprint object from a cDNA gene which changed. The result of having authorized gamma interferon activity was supported also by immunoprecipitation and protein blotting both ** of both (data are not shown). It was shown that the result discovered the gamma interferon whose pQ2 is 1microg/ml 72 hours after transfection.

These results are checking that VA RNA supports the increment in the manifestation by the adenovirus superinfection. The increment in the translation by Adenovirus VA RNA is the chloramphenicol acetyl from the initial promotor of SV40 again. The manifestation of a transferase is made to increase. As compared with the ** transfection of the plasmid containing the bottom cell chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene of initial promotor control of SV40, and the plasmid which lacks VA gene in the ** transfection of the plasmid containing an adenovirus VA gene, the CAT activity of a 5 to 10 times higher level is acquired. The manifestation which increased since CATmRNA was not increasing with ** transfection with VA gene in RNA blot analysis is for the increment in a translation. It increases under control of the initial promotor of SV40 with the transfection of a plasmid with which the manifestation of the plasmid containing a cell xanthin-guanine phosphoribosyltransferase gene also contains VA gene.

Similarly, if the manifestation of other atypical protein like a tissue plasminogen activator also uses DNA of the attachment like VA gene, it can increase remarkably.

If pL58 and pQ3 are introduced into ape valve flow coefficient1 cell by carrying out the non-transformation of the SV40 large T antigen by the plasmid which carries out a code, the same increment in translation effectiveness will be observed. Thus, the increment in translation effectiveness is not necessarily limited to a COS cell. Furthermore, a translation of the interior and secretion (DHFR and gamma interferon) both protein can be stimulated by VA RNA. The cell which transfected in gamma interferon cDNA recombinant (pQ2) produces interferon with the level of 1microg/106 cell 72 hours after transfection. When 5-10% of translation effectiveness is assumed, a trowel is the manifestation of a very high level. Finally, it is not peculiar to DHFR and gamma interferon, and the increment in translation effectiveness is Homo sapiens at the same vector. Interleukin 2 and Homo sapiens Both of proinsulin are also discovered efficiently.

表 1A

A. アデノウイルス重感染を判うトランスフェクション

プラスミド	構造		トランスフェクション後36時間	トランスフェクション後56時間	
	VA遺伝子	リーダー		アデノウイルス感染	偽感染
prIF-6	—	1	420	970	560
pL58	—	1-3	1,690	6,670	2,920
pQ2	+	1-3	15,200	11,550	26,320
pQ3	+	1-3	11,550	11,550	34,640

B. VA遺伝子との共トランスフェクション

プラスミド	pSV0d	pVASVOD
prIF-6	3,850	8,770
pL58	2,230	26,320
pQ2	8,770	20,000

Gamma interferon activity A. in the COS cell in which table 1A carried out explanatory note transfection and which reached and was infected by adenovirus It transfected in the plasmid DNA which displayed the COS cell. or [infecting a cell by adenovirus continuously, as indicated above] -- or fake infection is carried out. A sample is extracted for gamma interferon assay at the time (after [transfection] 36 hours) of adenovirus infection and 18 hours after infection (after [transfection] 56 hours). As indicated above, activity is determined and it expresses with a unit / ml/10⁶ cell.

B. Extract a sample for gamma interferon assay 60 hours after transfecting and carrying out transfection by the plasmid DNA which displayed the COS cell (with 2u/ml, pSV0d or pVASVOD(s) with each, and equivalence).

Example Configuration of three vectors p91023 (B) Transformation vector pAdD26SVpA (3) is indicated by Mol.Cell Biol.2(11):1304-1319 (1982) by Kaufman and others. It has the structure shown in drawing 3. When it says simply, this plasmid contains the mouse dihydrofolate reductase (DHFR) cDNA gene under the transcriptional control of an adenovirus 2 (Ad2) major late promoter. 5' splice site is included in Adenovirus DNA, and 3' splice site (guided from an immunoglobulin gene) exists between an Ad2 major late promoter and a DHFR coding sequence. The initial polyadenylation part of SV40 exists in the lower stream of a river of a DHFR coding sequence. pBR322 array in which the procaryote-flare part of pAdD26SVpA (3) is from pSV0d (Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y. and Maniatis, T.1981, and Cell 27:279-288), and checking the duplicate of a mammals cell is known is not included (Lusky, M. and Botchan, M.1981, Nature 293:79-81 (London)).

pAdD26SVpA (3) is changed into Plasmid pTPL as illustrated to drawing (3). Deletion of one of the two Bst I parts of pAdD26SVpA (3) is carried out, and pAdD26SVpA (3) is changed into plasmid pAdD26SVpA (3) and (d). This is attained by screening that in which

processes, connects by Klenow, re-cyclizes a plasmid, carries out the transformation of the *Escherichia coli*, and the Pst I part located in 3' of an SV40 polyadenylation array is carrying out deletion, after carrying out partial digestion (the subset of the plasmid made into the line from which the Pst I part of only one thing for which what has inadequate enzyme activity is used was cut is obtained) by Pst I.

As the reader and virus accompanying gene (VA gene) which were divided into three of adenovirus were illustrated to drawing 3, it inserts in pAdD26SVpA (3) and (d). pAdD26SVpA (3) and (d) are cut by Pvu II to the 1st, and it makes with the linear molecule opened in 1st 3' part of three elements which consist of three divided readers. Then, pJAW43 (Zain [et al.], 1979, Cell 16 851) is digested by Xho I, and it processes by Klenow, and digests by Pvu II, and the 138 base-pair fragmentation on acrylamide gel which carries out electrophoresis (inside of 6% tris boric-acid buffer solution; Maniatis et al. (1982) said reference), and contains a part of 2nd reader and 3rd reader is isolated. 138bp fragmentation is connected with Pvu II digestive pAdD26SVpA (3) and (d). Grunstein-Hogness for which it is used for an associated production object carrying out the transformation of the *Escherichia coli* to tetracycline resistance, and a colony uses ³²P indicator probe with which it hybridizes with 140 base-pair fragmentation -- it screens using law. DNA is prepared from the colony which the positivity hybridized and inserted 5' or 3' of the 138 base pair DNA examines whether it is in the Pvu II part specifically reconfigured by the 2nd or 3rd adenovirus anaphase reader. The direction of the right of a Pvu II part is in 5' end of 138 inserted base pairs. This plasmid is called pTPL of drawing 3.

The Ava II D fragmentation of SV40 including an SV40 enhancer sequence is obtained by digesting SV40DNA by Ava II, connecting a Xho I linker with fragmentation, digesting by Xho I, cleaving a Xho I part, and isolating large (D) fragmentation to the 4th by gel electrophoresis. The single direct iterative array of an SV40 enhancer is acquired by insertion of D fragmentation which attached the linker. This is the result of proportioning the amount of pAdD26SVpA (3) in D fragmentation which attached the Xho I linker in connection. The SV40 late promoter of the directivity of the SV40D fragmentation in pCVSVL2-TPL is the same as that of being the same direction like an adenovirus major late promoter.

In order to introduce an adenovirus accompanying (VA) gene into pCVSVL2-TPL, the plasmid pBR322 which contains adenovirus 2 mold Hind III B fragmentation in the 1st is constituted. The adenovirus 2 mold DNA is digested by Hind III, and after [gel electrophoresis] B fragmentation is isolated. This fragmentation is inserted in pBR322 beforehand digested by Hind III. Insertion of the Hind III B fragmentation of recombinant is screened after a transformation to AMUPISHIRIN *****, and *Escherichia coli* is determined as the path of insertion by restriction enzyme digestion. pBR322-Ad Hind III B contains adenovirus 2 mold Hind III B fragmentation towards having been drawn on drawing 4.

As illustrated to drawing 4, VA gene is conveniently obtained from plasmid pBR322-Ad Hind III B by addition of the digestive EcoR I linker by Hpa I, and digestion by EcoR I, and it collects as 1.4kb fragmentation. The fragmentation with an EcoR I cohesive end is connected with the EcoR I part of pTPL (it has digested by EcoR I beforehand). *Escherichia coli* HB one 101 is chosen in tetracycline resistance after a transformation, and a colony is

screened by filter high BURIZEISHIYON to a DNA probe special to VA gene. DNA is prepared from an electropositive hybridization clone and it checks by restriction enzyme digestion. A generation plasmid calls p91023.

Two EcoR I parts in p91023 are removed. The :1 ** which p91023 is completely cut [**] by EcoR I, and generates two DNA fragments is the fragmentation of 1.3kbs in which others contain VA gene in the fragmentation of AdMLP, TPL, DHFR, an SV40pA part, SV40Ava II fragmentation, a pBR322Tet gene, and about 7 replication origin (there is no poison field) kbs. The end of both fragmentation is filled with the Klenow fragmentation of Pol I, and both fragmentation (namely, 1.3kb and 7kbs) is re-connected together. Although the plasmid p91023 (A) contained VA gene like p91023, it was identified by the Grunstein-Hogness [be / two EcoR I parts / missing] screening using VA gene, and the usual limit part analysis. Except for the single Pst I part in p91023 (A), it transposes to an EcoR I part (drawing 5). p91023 (A) is completely cut by Pst I, it processes by the Klenow fragmentation of Pol I, and a flush end is generated. An EcoR I linker is connected with the Pst I part which n91023 (A) cut. a line -- it dissociates from the linker which has not combined p91023 (A) and (the EcoR I linker having combined with the cutting Pst I part), and by EcoR I, it digests completely and re-connects. Plasmids p91023 (B) are collected, and although having the same structure as p91023 (A) is identified, the EcoR I part is located in a front Pst I part. The plasmid p91023 with the product gene in which the EcoR I part was inserted (B) is deposited in American Type Culture Collection, Rockville, and Maryland by the ATCC number 39754 as pCSF-1 in Escherichia coli, and is available.

Example 4 It proves using cDNA which carried out the code of the Homo sapiens antithrombin III (AT III) in both of the cell which carried out the transformation of the usefulness of the vector containing the translation activator (adenovirus VA gene) indicated in the examples 2 and 3 to the cell and stability which transfected in transition. cloning [of the Homo sapiens antithrombin III cDNA] "the physiological inhibitor of coagulation and the fibrinolysis" (M.Verstvaeete [Wiman(ing) and] edit D. -- Collen and B. --) In Elsevier, Amsterdam, and 43 - 54 pages ** T.E.Petersen, G. by the hybridization to the specific oligonucleotide probe reasoned from the amino acid sequence by Dudek-Wojciechowska, L.Sottvup-Jensen, and S.Magnusson and others (1979) The perfect length cDNA who did the code of the Homo sapiens antithrombin III is isolated from a Homo sapiens liver cDNA library.

A Homo sapiens liver cDNA library is prepared with a conventional method (Maniatis et al.). polyA+mRNA was isolated from Homo sapiens liver, it processed with methylmercury, and 1st cDNA chain composition was carried out by reverse transcription. By the base, after processing, composition of the 2nd chain is made by the Klenow fragmentation of DNA polymerase I, and is accomplished, and the duplex chain cDNA continues, is processed by the Klenow fragmentation of S1 nuclease, EcoR I methylase, and DNA polymerase I, and cuts an end. Adding an EcoR I linker, EcoR I digestion removes a superfluous linker and it lets a CL4B column pass. cDNA is connected with g+10, and plate culture is packed and carried out by in vitro one (high frequency lysogenization agent obtained from C600hfl, Ron Davis, and Stanford University). The screen of a total of 500,000 is carried out by 2 sets of oligomer prepared from the amino acid (Met-Met-Tyr-Gln-Glu-Gly) of 243 to 248, and the amino acid (Glu-Glu-Met-Met-Leu-Val) of 304-309. if based on the denaturation of an

amino acid code -- 1 set of oligonucleotides -- from eight different 17-mers(es) -- becoming -- other things -- different **** 17-mers of 16 -- intermediary **** [from].

Hybridization is carried out in 5XSSC(s) containing the 5microg [/ml] denaturation salmon sperm DNA, 0.5%SDS, and 5XDenhart solutions. The electropositive thing of 38 hybridized to both probes is isolated, and a plaque is refined, and re-hybridization is carried out to an oligonucleotide probe, and it identifies. During progress of these experiments, Homo sapiens's AT III nucleotide sequence was announced by S.C.Bock and others (1982) (Bock, S.C., Wion, K.L., Vehar, G.A., and Lawn, R.M. Nuc. Acids Res, 10, 8113-8125).

Therefore, the 17-mers oligonucleotide which encloses Initiator ATG in order to isolate a perfect length clone (TATTCCAATGTGATAGG) was compounded and it hybridized with the electropositive thing of 38.) One of the electropositive objects of 13 is prepared and it is lambda AT III-C3 (naming AT3-(3), it contains about 1.4 kb insert.).

Insertion of AT III cDNA to an expression vector The expression vector used for an AT III manifestation was guided from pQ2 (drawing 2 (c)). pQ2 is digested by Pst I and 7.5KB fragmentation is isolated from agarose gel except for Interferon cDNA. Since cDNA for AT III does not include an EcoR I part inside, it can be cut by EcoR I digestion and isolates 1.4KB fragmentation from lambda AT3-C3 by agarose gel electrophoresis. It is a synthetic

Pst I 5' GGCGAGCCTG 3' EcoRI

adapter beforehand. :

ACGTCCGCTCGGACTTAA

EcoR I AT III fragmentation is inserted in a ***** vector. Addition of a synthetic adapter phosphorylates only 5' end of 10-mer, and is attained. It leaves the non-phosphorylation EcoR I end at which the background of a transformant is reduced by this thing. Low-melt point agarose gel electrophoresis extracts 7.5KB fragmentation after removing a superfluous adapter, and it connects with EcoR I AT III cDNA fragmentation. Grunstein-Hogness using the T-four end indicator (Englund, P.T. (1971), and J.B.C, 246, 3269-3276) cDNA fragmentation which uses connection mixture for carrying out the transformation of Escherichia coli HB one 101 to tetracycline resistance, and carries out the code of AT III cDNA -- an electropositive object is identified by screening by law (1975, PNAS, 72, 3961-32965). p91023AT III-C3 which obtained two clones contains AT III cDNA in a suitable direction about an adenovirus promoter, and p91023 4 AT III-E1 contains cDNA with the opposite sense. Plasmid p91023 AT III-C3 (pAT III-C3) (drawing 6) is deposited with American Type Culture Collection (Rockville, Maryland) as a receipt number ATCC99941 as a stock Escherichia coli-HB [101], and is available.

p91023-AT III-C-3 and p91023-AT III-E1 have 1.1KB deletion of the SV40 origin object for the duplicate by the PBR322 origin duplicate object for reproduction in Escherichia coli, the tetracycline resistance gene, and COS ape intracellular, and a pBR322 "poison" field (Lnsky.M. and M.Botchan (1981), Nature, 293, 79-81). The element of activation of a manifestation of COS ape intracellular cDNA an adenovirus major late promoter (AdMLP;SV40 enhancer (SV40AVA II D fragmentation); -- cDNA copy [of the reader divided into three of adenovirus]; -- 5' splice site from the 2nd intron of the reader divided into three) And the hybrid intron which consists of a 3' splice site from a mouse immunoglobulin gene () [Kaufman, R.J., and] [Sharp P.A.(1982) (Mol.Cell Biol., 2,

1304-1319);] They are initial field polyadenylation signal [of SV40],, and an adenovirus VA gene. The direction of 1.4Kb cDNA which carries out the code of the Homo sapiens antithrombin III was shown. p91023-AT III-C3 contains AT IIIKcDNA in the suitable direction to the imprint from AdMLP.

COS cell manifestation As indicated in the example 1, p91023-AT III-C3 and p91023-AT III-E1 were introduced with DEAE-dextran initiation transfection to COS ape intracellular. 24 hours after carrying out transfection, a cell is washed by the non-blood serum Dulbecco amelioration Eagle culture medium, and a conditional culture medium is extracted for the radioimmunoassay which uses the rabbit *-Homo sapiens antithrombin III (and it could depend) after 24:00. [Robert Rosenberg and] Or the indicator of the cell is carried out by 35S methionine (1 mCi/ml) 48 hours after transfection for 4 hours. A conditional culture medium is extracted, and as indicated in the example 1, a cell extract is prepared for immunoprecipitation and SDS-gel electrophoresis. The assay result of AT III in the COS cell conditional culture medium which transfected was shown in Table 2.

表 2

遺伝子工学による哺乳
類細胞中のATⅢはラジ
オイムノアッセイによ
り検定された。

CHO安定株	条件付け培地中のATⅢ
CHO-DUKX B ₁₁	.021nM
CHO-B ₁ -1.0neo	5.2nM
CHO-A ₁ -5.0neo	4.5nM
COS遷移的感染	
p91023-ATⅢ-E ₁	.018nM
p91023-ATⅢ-C ₃	1.92nM

Magnification of a AT III cDNA gene with a dihydrofolate reductase (DHFR) gene The Chinese hamster ovary cell (CHO) cell which lacked DHFR is indicated by PNAS, 77, and 4216-4220 (1982) by Urlaub and Chain. Plasmid p91023-AT III-C3, pSV2Neo (Southern, P. and P.Berg, 1982, J.Mol.Appl.Genet., 1,327-341), and pAdD26SVpA (3) [Kaufman,] [R.J.] And Sharp, P.A.Mol.Cell Biol., (1982), 2 and 1304-1319 are mixed together (25microg p91023-AT III-C3, 2.5microg pSV2Neo, and 2.5microg pAdD26SVpA (3)). To 0.3M, the ethanol of 2.5 capacity is added and sodium acetate (pH4.5) is settled. It leaves and is air-dry, it re-suspends in 2XHEBSS(s) (.5ml) (Chu and Sharp Gene, 13,197-202 (1981)) as indicated by J.Mol.Biol and 150:601-621 (1982) by Kaufman, and Sharp and others, and DNA which precipitated is .25M CaCl₂ (.). It mixes with 5ml violently. The ink bait of the calcium-phosphoric-acid-DNA precipitate is carried out at a room temperature for 30 minutes. Except for the culture medium of CHO DUKX-B(it is 24 hours before TORAINSUFUE cushion) 1 cell which carried out subculture beforehand, DNA-calcium phosphoric-acid precipitate is added into the cell of a single group with 5x10⁵ cell / 10cm pan. The alpha culture medium (Flow Labs) which contains smallness fetal calf serum 10 5ml% after a 30-minute incubation is supplied at a room temperature, and a cell is

incubated at 37 degrees for 4.5 hours. The 2ml alpha culture medium which contains glycerol 10% during 3 minutes at a room temperature (24 degrees C) except for a culture medium from the monolayer of a cell is added, the cell after removal is washed, and seeding is carried out to a calf embryo blood serum and the alpha culture medium which contains 10microg [/ml] thymidine, an adenosine, a deoxyadenosine, penicillin, and streptomycin respectively 10%. NUKUREO sides are lacked for a two days after cell including dialysis smallness fetal calf serum, penicillin, and streptomycin 10%, and subculture is carried out by 1:15 to the alpha culture medium containing G418 [1mg //ml] (GIBCO). Seeding of the four to five days after cell is again carried out to the same selective medium (a NUKUREO side is lacked). Subculture is carried out to a selective medium and a ten to 12 days after colony appears.

Pool a colony (about 20) from each pan, the concentration of methotrexate is made to increase except for the coexistence of G418 for maintaining the selectivity of sPV2Neo, and it increases. However, maintenance of pSV12Neo is not indispensable to magnification of an AT III cDNA gene. Even if it authorizes the pool of the beginning of a transformant by both SDD-polyacrylamide gel electrophoresis following the radioimmunoassay or the ³⁵S-methionine indicator, and immunoprecipitation of a conditional culture medium, it does not show AT III activity. however, 0. -- AT III can observe after the selection in 0.2, 0.1, and 1.0microM methotrexate content culture medium by both approaches (Table 1). A clone stock is henceforth obtained by dilution plating. AT III produced in COS and a CHO cell is activity because of the capacity combined to the thrombin, and it was shown that association under heparin existence is promoted.

example cDNA which carries out the code of the 5 tissue plasminogen activators (Homo sapiens) the conventional method which used the target mRNA for other cells included so much before -- therefore, the cDNA gene which carries out the code of Homo sapiens tPA by reverse transcription was obtained from mRNA isolated from the Bowes melanoma cell. tPA protein is isolated from a Bowes melanoma cell strain (more nearly available than Dr. Rifken (New York UniVersity)). The protein with which amino acid sequence analysis was found out from the Bowes melanoma cell to the conditional culture medium shows two things clearly included for a different **** amino terminal, and one amino terminal contains many three amino acid from other things. These two amino terminals are called a glycine N-end

(Gly-Ala-Arg-Ser-Tyr-Gln-Val-Ile-Cys-Arg-Asp-Gln-Lys-Thr-Gln-Met-Ile-Tyr-Gln-Gln-His) and a serine N-end

(Ser-Tyr-Gln-Val-Ile-Cys-Arg-Asp-Gln-Lys-Thr-Gln-Met-Ile-Tyr-Cln-Gln-His).

Messenger RNA is isolated from a Bowes melanoma cell, and it is used as mold for composition of cDNA as generally known for this field. cDNA is copied and a duplex chain is produced. A tetracycline **** plasmid vector is introduced by tailing or the synthetic linker in the single polymer which this field is sufficient as and is known. The transformation of the library (each clone contains the peculiar cDNA copy of the mRNA kind which exists in a Bowes melanoma cell) of the plasmid which cloned is carried out by the vector, Escherichia coli is prepared, and an antibiotic resistance Escherichia coli cell is chosen.

The plasmid in the cDNA library containing cDNA which carries out the code of a part of

tPA at least is identified by standard Grunstein and the Hogness screening procedure (72 Grunstein et al., 1975, PNAS, 3961). In this approach, the capacity to the probe which fixed and carried out the radioactive indicator of the DNA to the mold of a single chain hybridized or combined is screened. Such a probe is a short DNA oligonucleotide with the array which is in agreement with some [small] amino acid sequences of tPA protein. The amino acid sequence of the amino acid of 15-20 is used from the amino terminal of tPA (shown in drawing 7). Since the code of some of these amino acid is carried out by one or more nucleotide codons [three], the 17-mer probe covering all possibility is pooled with the following conventional methods. It carries out the screen of the cDNA library by the approach of Grunstein and Hopness until it is observed that the clone in a library hybridizes to a probe after that. Partial dideoxy which determines the upper array of a primer It checks that the clone is carrying out the code of a part of tPA by the usual approach learned as primer expanding (Wallace et al., Nuc.Acids Res., 93647-3656 (1981)). It is proved [this] that a clone contains the codon corresponding to the N-terminal-amino-acid array of tPA. cDNA by which existence was observed in the clone is isolated from a plasmid, carries out a radioactive indicator, and is used as a probe which identifies the fragmentation of tPA cDNA which the others observed all over a cDNA library overlapped one by one. This process is continued until the fragmentation which carries out the code of the parts of non-translating [mature tPA protein and] 5' and 3' field together (excepting the array which the duplex overlapped) is identified.

The cDNA clone which carries out the screen of the two ***** libraries, and covers the perfect coding sequence of tPA together was obtained. It was isolated from the library which attached the cDNA clone sam1 and the linker with S20 [unsymmetrical]. This library inserts in a suitable vector cDNA which produced with the following conventional methods (Maniatis et al., the guide for a molecular-cloning-experiment, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Harbor, N.Y (1982)), namely, connected cDNA from the Bowes cell mRNA with the Sal I linker by the EcoR I linker and under 5' under by 3', and connected it. The cDNA clone Ed1 was isolated from the GC-TERUDO cDNA library (Maniatis et al., said reference). Drawing 8 a is illustrating the cDNA clone Sam1 which consists of a group which overlaps partially, and S20 and Ed1 ranging over a tPA perfect code array.

The technique used for combining a single coding sequence together from three fragmentation was typically shown in drawing 8 b and 8c and 8d. Drawing 8 b is used for receiving fragmentation, and is illustrating the configuration of the plasmid for the duplicate of a perfect cDNA gene. The configuration of a plasmid YIp5 is indicated by Gene, 8, and 17-24 (1979) by Botstein and others. 2u yeast plasmid is a commercial item. Directions "+" show the restriction enzyme part in a plasmid. The processing by the restriction enzyme and/or the Klenow fragmentation ("Klenow" is often called henceforth) of DNA polymerase I is shown under the name of the degree of an arrow head. These enzymes are commercial items. Ordinary enzyme reaction conditions are used. Note that the DNA array which is not hydrolyzed by connection of the digestive product of a certain kind of restriction enzyme with other restriction enzymes is made. For example, a Hpa I part disappears with the configuration of YOp4 plasmid. Drawing 8 c and 8d of configurations of the plasmid containing the perfect length cDNA clone from three cDNA fragmentation identified in the library are illustrated. In drawing 8 (c), a plasmid YOp4 is cut by Xba I, an end is made

smooth by Klenow and a straight-line-like plasmid is again cut by EcoR I. The tPA cDNA fragmentation (please refer to the Sal I part enclosed with the frame of - drawing 7 containing a part for non-translating 5' end) containing 5' end of a gene is isolated from the plasmid by the digestive Klenow processing by Sal I, and digestion by EcoR I. a line -- although YOp4 and the tPA cDNA 5' fragmentation Sal I are connected and a plasmid I901 is formed, a Sal I part is formed of connection of Xba I and a Sal I part in that case. A plasmid I901 is connected with Escherichia coli, and the screen of the AMUPISHIRIN resistance is carried out.

A plasmid I901 is processed as shown in drawing 8 b, and it connects with 3' fragmentation (EdI) (it obtains by Bgl II, Klenow, and EcoR I processing in order of the plasmid) of tPA cDNA. A Bgl II part (drawing 7 surrounded and showed by the frame) is broken by connection to the Cla I digest of a plasmid I901. If the 1st thing which the Pst I-Bgl II and EcoR I-Pst I secondary fragmentation of tPA cDNA throws away is why, it is a non-coding region, the 2nd thing is for the field which overlapped the 3rd fragmentation S20 (drawing 8 c), and the array thrown away by S20 is supplied. Obtaining a plasmid J118 according to these processes, it is made to reproduce in Escherichia coli and carries out the screen of the ampicillin resistance.

A plasmid J118 is cut by EcoR I, and it connects with the tPA cDNA fragmentation S20 of the center shown in drawing 8 c. The suitable direction of S20 fragmentation in J205 is checked by unsymmetrical endonuclease digestion generally known for this field.

As Homo sapiens's tPA array announced before differs from the number of nucleotides and this tPA cDNA gene was shown in drawing 7, one amino acid is permuted.

Example Configuration of 6 transformation vector pLDSG The start plasmid of this example is known as pAdD26SVpA (3), and (Kaufman et al., Mol.Cell Biol.2(11):1304-1319) (1982). It has the structure indicated to drawing 9 a. When it describes briefly, this plasmid contains the mouse dihydrofolate reductase (DHFR) cDNA gene under the transcriptional control of an adenovirus 2 (Ad2) major late promoter. 5' splice site is included by Adenovirus DNA, and 5' splice site guided from the immunoglobulin gene exists between an Ad2 major late promoter and a DHFR coding sequence. The initial polyadenylation part of SV40 exists in the lower stream of a river of a DHFR coding sequence. pBR322 array (Lnsky, M. and Batchan, M.1981, Nature (London), 293, 79-81) in which the procaryote flare part of pAdD26SVpA (3) is from pSV0d (Mellon, P., Parker, V., Glnzman, Y. and Maniatis, T.1981, Cell, 27,279-288), and checking the duplicate of a mammals cell is known is not included.

pAdD26SVpA (3) is changed into a plasmid pCVSVL2 at the 1st process shown in drawing 9 a. SV40DNA is digested by AAva II, and a Xho I linker is connected with the fragmentation, it digests by Xho I, cleavage of the Xho I part is carried out, large (D) fragmentation is isolated to the 4th by gel electrophoresis, and the Ava II D fragmentation of SV40 is obtained. As shown in the 1st process, D fragmentation which combined the linker is inserted, and the single direct repeat of an SV40 enhancer is obtained. This is the result of proportioning Xho-I linker joint D fragmentation in the amount of pAdD26SVpA (3) at the time of connection. the direction of the SV40D fragmentation in pCDSVL2 -- an adenovirus major late promoter -- like -- an SV40 late promoter -- the same direction -- it is intermediary
**** profit.

pCVSVL2 is changed into a plasmid pB 2L2 according to 3 process processes planned so that it might agree for splicing in the J205tPA gene from an example 5. By Pst I (the line from which only one Pst I part was cut -- that to which enzyme activity fell so that the subset of a plasmid could be obtained is used), partial digestion of one of the two Pst I parts in pCVSVL2 is carried out, and it carries out [1st] deletion. It processes and connects by Klenow, a plasmid is re-cyclized, the transformation of the Escherichia coli is carried out, and the deletion of a Pst I part located in 3' of an SV40 polyadenylation array is screened. A plasmid is digested by Bgl II, it processes and connects [2nd] by Klenow, and that by which the Bgl II part (3' splice site of drawing 3 a) of the immunoglobulin intron of an Escherichia coli transformant colony was destroyed is screened.

A Pst I part is changed [3rd] into a Bgl II part by connection of digestion by Pst I, Klenow processing, and a Bgl II linker, and digestion by superfluous (100 units / mugDNA) Bgl II. the line to produce -- DNA is isolated by the gel electrophoresis in the low melting temperature agarose (1.2%) gel in the tris-acetic-acid buffer solution. This DNA is Inn. It connects at 24 degrees with 1microg [ml] concentration by the vitro, and Escherichia coli HB one 101 is used for transfecting (please refer to said reference of Hanatis and others). The colony of tetracycline resistance is grown up, DNA is prepared, Bgl II and Pvu II digestion analyze existence of the Bgl II part of 5' end of DHFR cDNA, and it digests by Pst I. DNA preparation on a lot of scales carried out ***** operation of the DNA twice by CsCl with a string.

pJ205 from an example 5 was digested by Hind III and Sal I, it processed by Klenow, and the BamH I linker was connected.

DNA to generate performs a phenol extract, extracts it under chloroform, adds the ethanol of 2.5 ** to 0.3M (pH4.5), and carries out ethanol precipitate of the sodium acetate. Centrifugal separation recovers DNA and a pellet is dried. A pellet is re-suspended, and in order to cut a BamH I linker, it digests by BamH I (100 units / DNAmug). A digest is applied to agarose gel and a 2.1kb band is identified. Bands are collected, the buffer solution of an amount -- 10mM tris HCl (pH7.4) and 1mM EDTA are included -- is added, it heats for 15 minutes at 68 degrees, and DNA is obtained. A phenol extract is carried out (2X), the chloroform extraction of the DNA is carried out (2X), and ethanol precipitate is carried out by the addition to 0.3M of sodium acetate (pH4.5), and addition of the ethanol of 2.5 **.

As illustrated to drawing 9 b, a vector pB 2L2 is digested by Bgl II, it processes by the cow alkaline phosphatase, a phenol (2X) and chloroform (2X) extract, and ethanol precipitate is carried out by addition of the ethanol of NaOAc (pH4.5) to 0.3M, and 2.5 **. This DNA that precipitated is connected with the 2.1kb fragmentation which combined the BamH I linker from pJ205. Connection DNA is used for the transformation of Escherichia coli HB one 101. the colony of tetracycline resistance -- Grunstein-Hogness -- it screens using specific 32P indicator probe to tPAcDNA by law. J205 is digested by Hind III and Sal I, an indicator is carried out by T-four DNA polymerase using the 32P-alpha dcTP, and a probe is produced. DNA is prepared from an electropositive hybrid clone and existence of tPA cDNA is screened by separate restriction enzyme digestion using Hind III, Pvu II, and Sac I. Not only existence of tPA cDNA but the direction of cDNA to the promotor in a vector is shown by these digestion. pLDSG is a plasmid containing tPA of a suitable direction. Example 7 is transfection and magnification. You mix Plasmid pLDSG, and pAdD26SVpA

(3) and (an example 6) together (50microg pLDSG and 0.5microg pAdD26SVpA (3)), and make it precipitate by addition of the ethanol of NaOAc (pH4.5) to 0.3M, and 2.5 **. It leaves and is air-dry, and Precipitate DNA is violently mixed with 0.25M CaCl₂ (0.5ml) as it re-suspends in 2xHEBSS (0.5ml) (Chn and Sharp Gene, 13,197-202 (1981)) and is indicated by J.Mol.Biol. and 150,601-621 (1982) by Kaufman and Sharp.

calcium-phosphoric-acid-DNA precipitate -- a room temperature -- for 30 minutes -- the --
 **** neglect is carried out and it applies to CHO DUKX-B1 cell (Chasin and Urlaub.P.N.A.S., 77, 4216-4220 (1980)). Maintenance of growth of these cells is already indicated (J.Mol.Biol. Kaufman and Sharp, said reference, Chasin and Urlaub said reference).

Subculture of the DUKX-B1 cell is carried out with a 5x10⁵/10cm pan 24 hours before transfection. Except for a culture medium, DNA-calcium phosphoric-acid precipitate is added into the cell of a monolayer. 5ml (Flow) of alpha culture media which contain a calf embryo blood serum after [an incubation] 10% for 30 minutes at a room temperature is added, and a cell incubates at 37 degrees C for 4.5 hours. Except for a culture medium, the 2ml alpha culture medium (Flow) of glycerol content is added for 3 minutes at a room temperature (24 degrees) 10% from the monolayer of a cell, the cell after removal is washed, and seeding is carried out to a calf embryo blood serum and the alpha culture medium which contains 10microg [/ml] thymidine, an adenosine, a deoxyadenosine, penicillin, and streptomycin respectively 10%. Two days after, although a dialysis calf embryo blood serum, penicillin, and streptomycin are included 10%, subculture is carried out to the alpha culture medium lacking in a NUKUREO side by 1:15. Seeding of the four to five days after cell is again carried out to the same selective medium (a NUKUREO side is lacked).

Subculture of the colony which appeared ten to 12 days after is carried out to a selective medium. Two graphs, methotrexate (MTX) selection and magnification, were pursued. By the 1st graph shown in the 3rd bottom, the single independent cloning transformant is isolated based on incorporation of foreign DNA (selector genes), and each clone is continuously increased under the condition to which product gene expression is made to increase (namely, growth to which the concentration of methotrexate is increased [make]). By the 2nd graph, the pool of a transformant where many became independent based on incorporation of foreign DNA (selector genes) is isolated, and it increases under the condition to which product gene expression is made to increase (namely, growth to which the concentration of methotrexate is increased [make]). Each clone is isolated from an ensemble and product gene expression is analyzed. The clone which shows the highest level of product gene expression is again grown up under the condition which a product manifestation increases further (that is, the concentration of the methotrexate in a culture culture medium is made to increase, and it acts as a chief of the shop).

The ***** result was shown in the graph 1 in Table 4. Each clone which can grow by the alpha culture medium without a NUKUREO side is chosen and increased, and tPA activity is authorized. Activity was recorded on the CTA mm unit / cell / day, i.e., mU / cell / day. . (see the following). The clone which shows tPA activity continued and was chosen in the continuous resistance to 0.02microMMTX, 0.1microMMTX, and 0.5microMMTX.

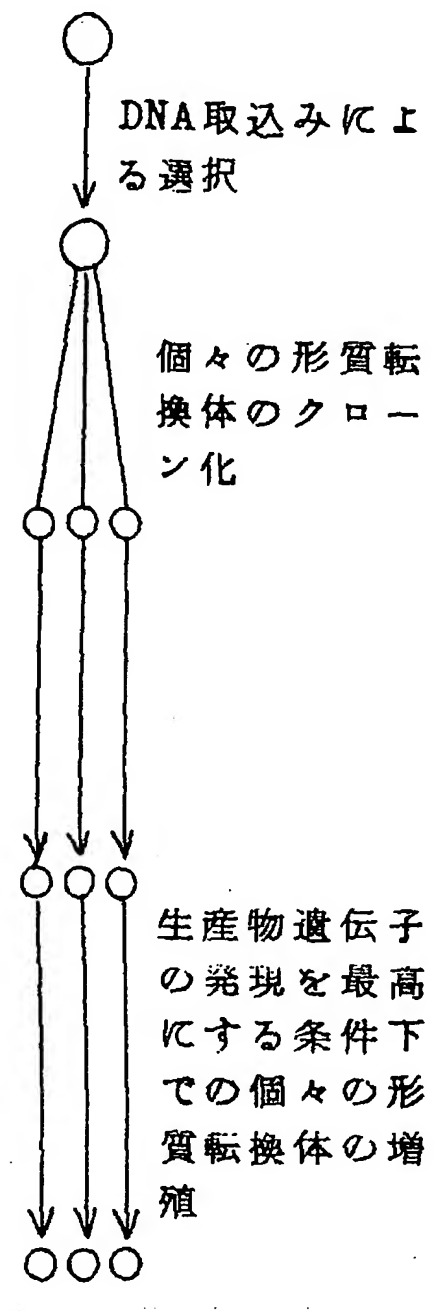
For clone 4C1, under MTX selection, the increment in tPA activity is inside ****. However, if bottom of MTX absent 4C1 is cultivated and a subclone (H3B and B10A) is generated,

they will amplify the case where it chooses in MTX resistance, and will discover tPA of a high level. It does not desire to restrict the approach here to a specific assumption, but this is considered to be the result of separation of the DHFR gene which has not been connected with tPA in the twin DNA from 4C1 transformant from the first. The subclone containing the single DHFR gene connected with the tPA gene amplifies DHFR and a tPA gene together with these clones by MTX selection.

表 3

製品の発現を最高にするための経路

経路 1



経路 2

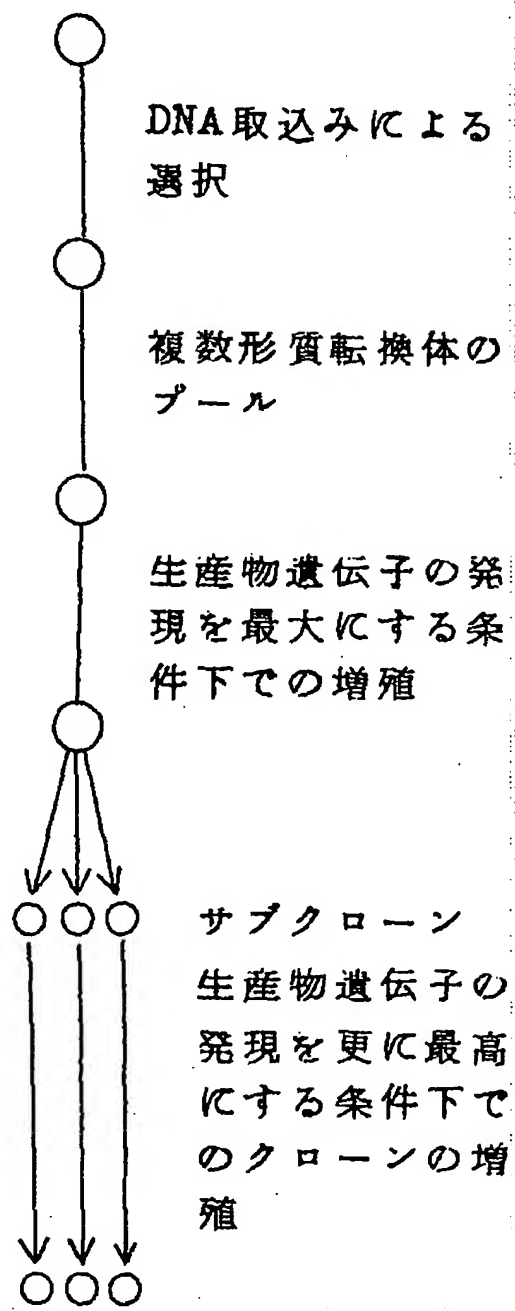


表 4

NTX耐性によって選択されたクローンにおける
tPA活性(mU/細胞/日)

クローン	MTX濃度(μ M)			
	0	0.02	0.1	0.5
1E2	0.2	0.015	0.005	0.005
4D2	0.015	0.0015	0.003	0.002
2D5	0.01	0.04	0.04	0.025
4C1	0.04	0.03	0.35	0.03

4C1サブクローン

H3B	0.09	0.26	1.0	—
-----	------	------	-----	---

クローン	MTX濃度(μ M)			
	0	0.02	0.1	0.5
B10A	0.025	0.09	0.19	—
H8B	0.02	0.045	0.035	—
H12B	0.05	0.15	0.065	—
D8B	0.08	0.095	—	—

The result depended on a path 2 is shown in Table 5. The pool with about 300 colony obtained by the subculture by selection in the culture medium which does not contain a nucleoside was prepared (colony from a selection plate). Therefore, these transformants chose these transformants as the SEKUENSHIYARU resistance over 0.02microM MTX and 0.05microM MTX. the culture in the inside of the culture medium in which the transformant by which origin was pooled contains 0, 0.02, and 0.5microM MTX -- respectively -- 0. -- although the tPA activity of 0.3, 0.9, and a 1.9mU(s) / cell / day was acquired, each clone in an ensemble discovered tPA in the amount shown in Table 5. For each clone, tPA manifestation level is ***** at 50 ** of the range of 0.2mU(s) / cell / day to 10mU(s) / cell / day. in order that this path may identify promptly the clone which discovers extensive tPA activity -- ***** -- ** Probably, the path 1 of make [combining a path 2 / more / the transformant of fecundity] will be clear.

表 5

	PA活性 mU/細胞/日
ヌクレオシドを含まないアルファ培地中 での増殖による300形質転換体の選択	0.03
↓	
0.02 μ M MTX中での増殖により選択され た細胞	0.9
↓	
0.05 μ M MTX中での増殖により選択され た細胞	1.9
↓	
0.05 μ M MTX中のクローン	
#3	4.25
4	7.0
5	1.6
9	3.5
12	6.25
13	1.55
16	0.2
18	0.3
20	10.0

Monitor of a tPA manifestation The susceptibility assay about existence of tPA which acts as the monitor of the tPA carried out the catalyst of the inversion to the plasmin of the plasminogen under existence of a fibrin. Plasmin is detected by emission of the ^{125}I -fibrin fragmentation from the ^{125}I -fibrin currently fixed to the plastics plate (therefore, detected by decomposition of J.Biol.Cbem.251 5694-5702 (1976) or coloring matter sexuparaous substrates, such as Strickland, (Biochemie(s) 61,403-471 (1979), such as Drapier.)). A suitable coloring matter sexuparaous substrate (called S2251) is obtained from Kabi (Diagnostics, Inc.Greenwich.CT). These assays are well known by this contractor and are mentioned by the above Drapier, such as Above Astrup, etc. tPA activity rinsed the plate (4×10^5 cell / 10cm plate) which has a cell by 5ml of serum free media, and, therefore, it was measured by adding 4ml of serum free media subsequently. The cell was incubated at 37 degrees C for 20 hours, and the sample in a temper culture medium was taken out to assay. Measurement of activity was expressed with the unit of mU / cell / day. By the assay under such conditions, Bowes melanoma cell Rhine produced 0.02mU(s) / cell / day. Homo sapiens's tPA specific activity is 100,000 units / mg, and is *****. A ^{125}I -fibrin or the catabolic rate of S2251 is directly correlated with the amount of tPA(s) which carried out the catalyst of the inversion to plasmin from plasminogen. The sample of the temper culture medium from the cell into which the tPA manifestation is missing produces only the background which can be disregarded in these assays. This background that can be disregarded is based on the protease which is not the activated fibrin. Because, the background in coloring matter sexuparaous substrate assay is for therefore not changing

from ***** assay to removal of a fibrin. In contrast, the activity from tPA sexuparaous CHO cell Rhine shows the fibrin activation which is like therefore being shown in the Bowes melanoma tPA extremely. Therefore, it is obtained by that the quantum of tPA activity compares with the standard curve which uses urokinase (Leo Pharmaceuticals, Belgium). The unit (CTA; thrombolytic agent committee) of activity is defined by comparing with the WHO correlation sample of urokinase.

composition of tPA -- single -- an increase -- a cell (2×10^6 / 10cm) is twice washed by the culture medium which does not contain a 5cm methionine, and it acts as a monitor by adding 1ml of culture media which do not contain the usual methionine including 1mCi³⁵S methionine. They are Staphylococcus, incubating a cell at 37 degrees C for 4 hours, and using a temper culture medium as immunoadsorbent. It authorized by carrying out immunity precipitation with **-Homo sapiens tPA of a rabbit using AUREUSU.

According to the result obtained by carrying out gel electrophoresis of all the labeled proteins that were secreted from KORONH3B, the only big difference in the secretory protein between the original H3B subclone increased in the culture medium which does not contain a nucleoside, and H3 B cell chosen about the growth in 0.1microM MTX is existence of the powerful band which migrates to 67,000dalton. This band carries out immunity precipitation specifically with the **-Homo sapiens tPA antibody of a rabbit, and is ***** (ed) with tPA similarly prepared from Bowes melanoma cell Rhine. It is shown that Homo sapiens's tPA manifestation ***** these results ten times at the time of selection of the H3B clone which has resistance in 0.1microM MTX.

Example Reclamation of 8 contiguity RINKUTO vector This example explains reclamation of the transformation vector which combined the halt codon of tPA the initiation codon of DHFR, and directly. This removes tPA3' and a DHFR5' untranslation region from pLDSG developed in the example 6. This example is based on use of the DNA oligonucleotide for carrying out the priming of the DNA synthesis from a M13 phage tempeh rate ("Method in Enzymology Vol.100:468-509, such as 209:1396 (1980), Zoller(s), etc., such as Wallace). Refer to Fig. 10.

It was decomposed by BamH I and, therefore, pLDSG isolated 4.5kb fragmentation to gel electrophoresis. This field includes most non-pBR322 fields of pLDSG. Phage M13 mP8 is decomposed by BamH1. Subsequently, the straight-line-ized phage is combined with the 4.5kb fragmentation of pLDSG, and M13 reclamation object is used for the transformation of a host bacterium (JM103). A plaque is screened by the approach of 196 (1980) of Benton-Davis using the probe which carried out the indicator by 32P united with a tPA gene. The just united clone is increased and a replicative form DNA is produced. The well-known technique using the decomposition (BamH1, EcoR1, and Pvu II) by restriction endonuclease can determine the direction of the right of a tPA gene.

Phage DNA is isolated from the plaque which shows the direction of the right. This single stranded DNA can use the field of the phage which should be removed with the synthetic primer which constructs a bridge. intermediary **** to which the function of a primer is united with DNA which is the removal field of 5' and 3', and a location therefore comes for this -- DNA which is not desirable is loop-formation-ized and it prevents that such DNA acts as a tempeh rate in a next primer extension process. In Fig. 10, the correspondence location in 5' of a primer, three ends, and M13-LDSG is named B and A, respectively.

A primer is tPA gene-TAA-ATG [in / therefore it is made by chemosynthesis and / the amino terminus of DHFR-3']. - It consists of nine translated nucleotides of the 5'-end of nine translated nucleotides following this.

Phage DNA and a primer are mixed and, therefore, a primer is extended by T4 DNA ligase and the Klenow fragmentation of DNA polymerase I. Generally this is explained in reference, such as Zoller(s), such as Above Wallace. It is used for a product carrying out the transformation of JM103. The replicative form phage DNA from a plaque is united with a 32P-labeling primer, it is checked as a dideoxy nucleotide sequence which therefore removed to Sanger the field which is not desirable (Proc.Natl.Acad.Sci.74pp(s) 5463-5467 (1977), such as Sanger), and this is decomposed by BamH1, and tPA gene content fragmentation is isolated by electrophoresis. It dissociates from gel and this fragmentation is combined with 2.5kb BamH1 fragmentation of pLDSG obtained by the BamH1 aforementioned decomposition. A joint product is used for the transformation of E Coli HB101, identifies a tetracycline resistance clone, and makes and specifies plasmid DNA. 2. The direction of 5kb and 4.5kb fragmentation identifies a right plasmid as pLDSGL. This plasmid can be used instead of pLDSG and pAdD26SVpA (3) as a RINKUTO vector in an example 7.

Example 9 pLDSG is decomposed by BamH1, and as shown in Fig. 10, a 4.5kb flag noodle is isolated. With the 2.5kb fragmentation by BamH1 decomposition, all pBR322 fields are removed on parenchyma. pAdD26SVpA (3) is decomposed similarly. It is used for tPA and DHFR gene content fragmentation carrying out the transformation of the CHO cell, as pLDSG and pAdD26SVpA (3) are shown in an example 7.

Example Vector containing 10 adenovirus TORIPA tight reader and VA gene The approach of this example is explained in Fig. 11. In order to develop a vector including an adenovirus TORIPA tight reader, pB 2L2 is left, this is cleft by Pvu II, and a linear molecule is created. Subsequently, pJAW43 (Zain etc. decomposes 16,851 (1979) by XhoI, and is processed by Klenow, and it decomposes by Pvu II, and also 138 base-pair fragmentation is isolated by the electrophoresis (6%[in a tris borate buffer]; Maniatis (1982) etc.) by acrylamide.) Subsequently to the Pvu II decomposition pB 2L2, 138bp fragmentation is combined. the probe which is used for carrying out a transformation to tetracycline resistance in EColi, is labeled by 32P, and unites a joint product to 140 base-pair fragmentation -- using -- Grunstein-Hogness -- it screens by law. It examines whether it is 5' of the 138 base pair DNA which creates DNA from the just united colony and by which the reproduced Pvu II site was specifically inserted in the after [the 2nd and 3rd adenovirus] reader, or it is 3'. 138 base pairs will be inserted in 5' side in the direction of the right of a Pvu II site. This plasmid names it pB2L2]-TPL.

In order to insert an adenovirus related (VA) gene in pB2L2-TPL, the 1st is decomposed by adenovirus type 2DNAHind III. E fragmentation is isolated after the gel electrophoresis by the well-known approach. This fragmentation is processed by Klenow and it decomposes by Hpa I, and it is made to combine with an EcoR I linker (common target), and decomposes by EcoR I, and a 1.3kb band is separated from agarose gel. This fragmentation is combined with the EcoR I site of pB2L2-TPL **** decomposed [EcoR I]. E Screen a colony by filter fusion to a DNA probe specific in VA gene after selection by the transformation and tetracycline resistance of Coli HB101. DNA is created from the just united clone and it

specifies by restriction endonuclease decomposition. A generation plasmid is decomposed by pB2L2-TPLV. This is replaced with pB 2L2 of an example 6, and is used suitably, Qualification pLDSG is generated and this product is used with pAdD26SVpA (3) in the approach of an example 7.

Example Reclamation of the vector containing 11 immunoglobulin enhancer This Vector pSer is described to be ("Cell"33:717-728, such as Gillies (1983)) is an induction object of pSV2GPT from which the SV40 enhancer is removed (Sph1 from Pvu II, base pairs 64-270). Refer to "Science"209:1422-1427 (1980) for Mulligan etc. This DNA is coding the resistance over a mycophenolic acid, when a cell is increased under existence of a xanthin and hypoxanthine. 1kb fragmentation containing the immunoglobulin enhancer guided from the constant region of a mouse immunoglobulin was inserted in the EcoR I site of pSer, and pSerx 2/3 was guided.

This vector has one BamH I site. This is decomposed by BamH1, and it processes by basic phospho TAZE, and, subsequently to the fragmentation of pLDSG, joins together. Therefore, this fragmentation is made by the decomposition by BamH1, and separation of big (4.5kb) fragmentation, as shown in an example 8. an intersection [as opposed to / it is used for combined DNA carrying out the transformation of Ecoli HB101 therefore chosen as ampicillin resistance, and / a 32P labeling tPA probe in a colony] -- existence of the tPA gene depended coarsely -- therefore -- Grunstein-Hogness -- it screens by law. This probe can decompose J205 by Hind III and Sal I, and can make it by labeling by T-four DNA polymerase at this NDA under existence of dTTP and dATP which do not contain 32 P-alpha-dCTP and radioisotope, and dGTP. The just crossed clone is increased and plasmids are collected. the -- 12alpha Fig. explains this vector (p7B1). this DNA -- Sandri-Goldin of protoplast fusion -- it is introduced into myeloma cell J558L which is explained to said Gillies which is the strange method of law. fusion hours [36 hours] after a protoplast and a cell -- a 5mg [/ml] mycophenolic acid and a 250microg [/ml] xanthin -- it increased in the culture medium which wears and contains 15mg [/ml] hypoxanthine, and the cell which incorporated plasmid DNA was chosen. One clone isolated by this approach discovered tPA at a rate of 0.05mU(s) / cell / day. Other suitable parent cells are ATCC CRL1580 or other non-secretory myeloma cell strains.

Example Reclamation of the vector activated in 12 imprints Transition activity imprint nature activator E1A is used with a vector including initial field of adenovirus 2 promotor. pCVSVL is indicated by "Mol.Cel.Biol" 2 (11) 1304-1319 (1982), such as Kanfman. pCVSVL is decomposed by Bal, and it processes by Klenow, combines with a Xho1 linker (having-two-incomes target), decomposes by Xho1, and decomposes by EcoR1, and 4.2kb fragmentation is isolated by gel electrophoresis.

Adenovirus 2DNA is decomposed by EcoR1, and EcoR1F fragmentation (map units 70.7-75.9) is collected. F fragmentation was decomposed by Xho1, and E2 promotor subfragmentation was isolated by gel electrophoresis. This subfragmentation has EcoR1 and Xho1 sticky end, and is combined with EcoR1 and less than one Xho of the 4.2kb fragmentation of pCVSVL obtained above. It is used for the plasmid obtained carrying out the transformation of the bacteria. The clones crossed to labeling E2 probe are collected as pE 2-7. pE 2-7 is a DHFR cDNA gene using the initial field promotor of adenovirus.

Therefore, reclamation of pE 2-7 is given to the approach of R.Kingston and P.Sharp. Refer

to Mol.Cell Biol., Vol.4, and pp 1970-1977 (1984).

Partial decomposition is carried out by Pst1, and it is processed by Klenow, and is combined with a Bgl II linker, and pE 2-7 is decomposed by Bgl II. Therefore, the tPA gene from pJ205 (the 9b Fig.) can be inserted in this with a conventional method at pE 2-7.

a part of pJ205 with a tPA gene -- the -- as shown in 9b Fig., it excises from pJ205, and a BamHI **** end is combined with the Bgl II adhesion end of pE 2-7, and plasmid pE2-7PA shown in the 12th (b) Fig. is obtained. pE2-7PA is a tPA gene using initial field of adenovirus 2 promotor. An E1A gene and a promotor are obtained as Kpn1 fragmentation (10 - 5.8 map unit) of adenovirus 2.

A pE2-7PA, pE2-7, and E1A gene vector carries out the transformation of the CHO cell as it is used by the mole ratio of 20:1:4 and is further indicated by the example 7. Thus, 0.008mU(s) / cell / product from Hinase of the tPA activity are carried out by the isolated transformant. In the transformant (pE2-7PA which has pE 2-7 by the ratio of 20:1) which omits an E1A gene and is obtained, 0.0003mU(s) / cell / day is discovered slightly.

Example Change in the cytomorphology relevant to the increment in 13tPA manifestation
By the growth and selection under the optimum conditions of tPA composition, the different **** cell of a gestalt which cannot adhere to a tissue culture pan is obtained. To the pool of 300 transformants increased in the non-nucleoside culture medium (what currently explained in an example 7 and Table 4) which produces low level tPA (0.01mU / cell / day), it is a CHO cell with the description on an even gestalt. The level of tPA increases selection which was explained in Table 4 about growth in MTX below 0.05microM to 0.6mU(s) / cell / day a ***** case, and the change on a gestalt is ***** clearly. Such change is clear also in the clone (for example, clones 9, 12, and 20) which produces more than 1.2mU(s) / cell / day.

These cells do not adhere to a tissue culture pan, therefore the selection by the tPA manifestation of a higher level is difficult. Therefore, this was conquered by using the embryo calf blood serum which does not contain adding the aprotinin (sigma) to a culture medium (0.5 - 5%v/V), or plasminogen. The result of these processings is ****(ing) the toxicity by which the load's was carried out to the cell which produces tPA of a high level. Therefore, a non-plasminogen blood serum is obtained by making the column of lysine-sepharose 4B (Pharmacia manufacture) pass a blood serum so that it may be explained to Deutsch and Mertz "Science" (1970) p1095.

Example Manifestation of EPO in 14COS cells The clone containing an erythropoietin (EPO) gene was created from the Homo sapiens embryo liver library by the gene optical technique. The EPO clone which names lamda HEPOFL13 has the nucleotide sequence and amino acid sequence which are shown in Fig. 13. 13 are inserted in the clone lamda HEPOFLp91023 (B) vector, and infected this contractor with COS-1 cell using the well-known gene optical technique. You made it infected with 5x10⁶COS-1 cell by the DEAE-dextran method using 8micro of each g of purification plasmid DNA ("Nuc.Acids Res., such as "Proc.Natl.Acad.Sci."78:7575-7578 (1981), Luthman(s), etc., such as Sompayrac,"11:1295-1308 (1983)). The cell was washed 12 hours after, and by chloroquine - (0.1mM), 37 degrees C was processed for 2 hours, and it washed again, and put to the 10ml culture medium which contains 10% of new-born calf serums 10% for 24 hours. This culture medium was changed into the 4ml serum free medium, and it collected 48 hours after.

Therefore, the quantum was carried out to radioimmunoassay to which production of the

immunity activity EPO (alpha) is explained by Sherwood and Goldwasser (Blood, 54:885-893 (1979)), and it became clear that it was 300 ng/ml.

The p91023 (B) vector containing lamda HEPOFL13 was also infected without chloroquine processing with COS-1 cell, and was proliferated. [as well as the above] The in vitro bioactive of EPO is based on the colony formation assay by the embryo liver cell of the mouse which is the source of supply of CFU-E, or the splenic cells from phenylhydrazine injection MAISU are used for it. Therefore it was measured by 3H-thymidine incorporation assay, and the 2 U/m and 3U/ml value was acquired, respectively. Moreover, the in vivo bioactive of EPO was measured using the hypoxia-like mouse method or the fast rat method, and acquired 1 (CFU-E) and 2(3 H-Thy) U/ml of value, respectively.

Example Manifestation of EPO in 15CHO cells (reclamation of a vector PK 1-4)

Plasmid pSV2D HFR (Subramani etc. isolated the BamH I-Pvu II fragmentation (fragmentation A) from "Mol Cell Biol"1:854-864 (1981).) including the initial field promoter of SV40 who adjoins the dihydrofolic acid reductase of a mouse, an SV40 enhancer, the small t antigen intron, and an SV40 poly adenyl array The remaining fragmentation was obtained from the vector p91023 (A) as follows. In the single Pst I site near an adenovirus promotor, carry out Pst I decomposition of p91023 (A), and a plasmid is straight-line-ized. Subsequently, [whether it joins together and a re-ring closure (: which makes a Pst I:EcoR I site to the Pst I site of a dimension 91023 (B')) is carried out to a synthetic Pst I-EcoR I converter, and] Or it processed by the large fragmentation of DNA polymerase I, and the Pst I site was eliminated, it joined together and the re-ring closure (: which makes an EcoR I site to the Pst I site of a dimension 91023 (B)) was carried out to the synthetic EcoR I linker. Fragmentation A and fragmentation p91023 (B') of the p91023 (B) origin are combined, and it is ***** about two new plasmids. these plasmids -- an EcoR I-Pst I site -- or ***** which has either of the Pst I-EcoR I sites in the original Pst I site. The plasmid in which a Pst I site includes the Pst I-EcoR I site nearest to an adenovirus main late promoter was named p91023 (C).

The vector p91023 (C) was completely decomposed by Xho I, and straight-line-ized DNA by which the adhesion end may have been held was graduated at the end filling reaction by the large fragmentation of Ecoli of DNA polymerase I. The 340 bpHind III-EcoR I fragmentation containing the SV40 enhancer made as follows was combined with the above-mentioned DNA.

The Hind III-Pvu II fragmentation from SV40 containing the SV40 origin of a duplicate was inserted in plasmid pilac (Mol Biol Med.1:473-488, such as Little (1983)). This pilac vector decomposed pilacDNA by BamH I, carried out the fill-in of the adhesion end by the large fragmentation of DNA polymerase I, and was produced by decomposing this DNA by Hind III. Therefore, the BamH I site was reproduced to combine the obtained plasmid (piSVHPlac) with a Pvu II flush end. EcoR I-Hind III fragmentation was made from SVHPlac, and the plasmid pSVHPod which combined with the EcoR I-Hind III fragmentation of PSVOd(s) (above Mellon etc.) containing the plasmid origin of a duplicate, and was obtained was chosen. The 340 bp EcoR I-Hind III fragmentation of PSVHPod containing an SV40 origin / enhancer was made, and the both ends were made smooth by the large fragmentation of DNA polymerase I. The direction of Hind III-EcoR I1 fragmentation is an intermediary **** plasmid [as] (p91023 (CO/Xho/smoothing +EcoR I/Hind III /

smoothing SV40 origin + enhancer) was named pES105.) with the BamH I site nearest to VA gene in the fragmentation. It is BamH I and Pvu II, and the plasmid pES105 was decomposed by the Pvu II independent, and the Pvu II fragmentation (fragmentation C) which has the DNA array of the BamH I-Pvu II fragmentation (fragmentation B) containing an adenovirus main late promoter, a plasmid with a resistance gene (tetracycline resistance), and others was isolated. Fragmentation A, B, and C was combined, the obtained plasmid which was shown in Fig. 14 was isolated, and it was named RK 1-4. The plasmid RK 1-4 was deposited with ATCC of U.S. Maryland and Rockville as ATCC No.39940.

Manifestation of EPO Clone DNA from a lambda HEPOFL13 was decomposed by EcoR I, and the subclone of the small RI fragmentation containing an EPO gene was carried out to the EcoR I site of a plasmid RK 1-4. This DNA (RKFL13) was used for infecting a DHFR-deficit CHO cell directly (without decomposing), and was chosen and expanded as follows. The cell which incorporated at least one DHFR gene was chosen after the growth for two days excluding the nucleoside in the alpha culture medium which filled up the dialysis new-born calf serum 10%. After increasing [of two weeks] in the inside of a selective medium, except for the colony, it pooled in the group of each ten to pool 100 colony from the original plate, and the re-plate was carried out and it increased completely in the alpha culture medium which does not contain a nucleoside. The culture-medium supernatant liquid from the pool increased before METOTOREKIZETO selection was authorized about EPO by RIA. The subclone of the pool which showed electropositive EPO production is carried out immediately, it re-authorizes, and a further electropositive thing is ***** about an incremental selection (refer to following). The MERITOREKIZETO resistance colony obtained from the corresponding culture increased by RIA in existence of MERITOREKIZETO (mlthotrexate, 0.2 micrometers) about the pool which is negative was authorized about EPO among the pool by RIA. a positivity -- ***** -- the subclone of the culture of these is carried out, and the concentration of meso TOREKIZETO was increased further and it was made to increase.

Therefore, it is ***** to the repetition cycle which cultivates a cell under existence of MTX which increased concentration for gradual meso TOREKIZETO (MTX) selection. In each phase, EPO was measured about the culture supernatant by RIA and in vitro bioactive. MTX(s) used for the increment in concentration of each phase are 0.2microM, 0.1microM, and 0.5microM, and are *****.

RKFL13DNA was inserted in CHO intracellular by micro injection. Extent of the obtained EPO manifestation is shown in Table 6.

表 6

培地中に放出されたEPO水準

サンプル	検定	α -培地回 収	0.02 μ M MTX 含有 α -培地 回収
コロニーブール A	RIA	3ng/ml	42ng/ml (ブール)
			150ng/ml (クローン)
	3H-Thy	—	1.5U/ml
単一コロニーク ローン(0.2C- Z)	RIA	—	90ng/ml
	3H-Thy	—	5.9U/ml
マイクロインジ エクトドブ ール(DEPO-1)	RIA	60ng/ml	160ng/ml
	3H-Thy	1.8U/ml	—

This invention was explained to the detail including the desirable mode. However, it will be understood by considering these indications that this contractor can perform modification and amelioration within the limits of this invention.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

(57) [Claim(s)]

[Claim 1] Are two or more vectors which have not been combined and one of vectors [them] with the technique which carries out coincidence transfection by two or more vectors which are vectors containing the product gene made into the purpose It is the approach of carrying out the transformation of the animal cell and introducing a product gene. The (a) promoter, It is the 1st vector containing the product gene under the transcriptional control of the 1st promoter and this 1st promoter. This 1st vector contains the selector genes under the transcriptional control of the 2nd promoter depending on this 1st vector; and the (b) above-mentioned promoter which do not contain selector genes under accommodation of this 1st promoter. The above-mentioned approach of being the 2nd vector which has not been combined and carrying out coincidence transfection of the animal cell using the 2nd vector which does not contain the above-mentioned promoter.

[Claim 2] The method given in the 1st term of a patent claim of separating the cell which chose this coincidence transformed cell that is a coincidence transformed cell produced in this way, and may discover both product gene and selector genes, and was chosen by making it such from other cells.

[Claim 3] The approach given in the 1st term of a patent claim each vector has a polyadenylation region on the lower stream of a river of a product gene and selector genes, respectively.

[Claim 4] The approach given in the 1st term of a patent claim a product gene carries out the code of the tissue-type plasminogen activator.

[Translation done.]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭61-12288

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和61年(1986)1月20日
C 12 N 15/00 7115-4B
5/00 7115-4B
9/64 7421-4B
C 12 P 21/02 7235-4B ※審査請求 未請求 発明の数 7 (全41頁)

⑮ 発明の名称 真核細胞の形質転換のための補助DNAを含むベクター

⑯ 特 願 昭59-281862

⑰ 出 願 昭59(1984)12月27日

優先権主張 ⑱ 1983年12月27日 ⑲ 米国(U S) ⑳ 565627

㉑ 1983年12月27日 ⑲ 米国(U S) ㉒ 566057

㉓ 1984年12月4日 ⑲ 米国(U S) ㉔ 677813

㉕ 発 明 者 ランディール・ジェイ・ アメリカ合衆国マサチューセッツ州02116, ポストン, マ
コーフマン ールボロ・ストリート 111

㉖ 出 願 人 ジェネティックス・イ アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ポストン, ロ
ンスチチュート・イン ングウッド・アベニュー 225
コーポレーテッド

㉗ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外5名
最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. [発 明 の 名 称]

真核細胞の形質転換のための補助DNAを含む
ベクター

2. [特 許 請 求 の 範 囲]

1) 真核細胞中に異種DNAを導入するためのベ
クター系であつて、該ベクター系が生産物遺伝
子と補助遺伝子とから成るベクター系。

2) 前記補助遺伝子が、翻訳活性化因子をコード
化する遺伝子、トランス作動性転写活性化因
子、または形質転換されるべき真核細胞からの
ゲノムDNAのフラグメントを含む特許請求の範
囲第1項記載のベクター系。

3) 更に、選択遺伝子を含む特許請求の範囲第
1項記載のベクター系。

4) 生産物遺伝子、選択遺伝子および補助DNA
が共有的に結合されていない特許請求の範囲第
3項記載のベクター系。

5) 補助DNAがキャリアーDNAでない特許請求
の範囲第1項記載のベクター系。

6) 生産物遺伝子および選択遺伝子が共有結合
している特許請求の範囲第1項記載のベクター
系。

7) 補助DNAが翻訳活性化因子をコード化して
いる遺伝子を含む特許請求の範囲第2項記載の
ベクター系。

8) 生産物遺伝子の発現を調節するように、生
産物遺伝子を作動的に含むベクター内に位置す
るプロモーターを含む特許請求の範囲第1項記
載のベクター系。

9) プロモーターが3部分リーダーを含むア
デノウイルス主後期プロモーターであり、補助
DNAが翻訳活性化因子をコードする遺伝子であ
る特許請求の範囲第8項記載のベクター系。

10) プロモーターが3部分リーダーを含むア
デノウイルス主後期プロモーターであり、翻訳
活性化因子をコードする遺伝子がアデノウイル
スVA遺伝子である特許請求の範囲第9項記載
のベクター系。

11) 生産物遺伝子および選択遺伝子が結合さ

れており、しかしながらプロモーターの制御下で翻訳活性化因子をコード化する遺伝子が生産物遺伝子または選択遺伝子のいずれにも結合していない特許請求の範囲第10項記載のベクター系。

12) 補助DNAが形質転換されるべき真核細胞からのゲノムDNAフラグメントである特許請求の範囲第2項記載のベクター系。

13) 複数の不規則に異つたフラグメントから成る特許請求の範囲第12項記載のベクター系。

14) フラグメントが、生産物遺伝子および/または選択遺伝子を含むベクターに結合される特許請求の範囲第13項記載のベクター系。

15) フラグメントが生産物および/または選択遺伝子を含むベクターの5'および3'末端に結合される特許請求の範囲第14項記載のベクター系。

16) 補助DNAが、トランス作動性転写活性化因子をコード化する遺伝子を含む特許請求の範囲第2項記載のベクター系。

られた形質転換体。

24) 特許請求の範囲第23項記載の形質転換体を生産物が集積するまで培養し、培養物から生産物を回収することから成る生産物を生産する方法。

25) プラスミド p91023(B)。

26) 更に生産物遺伝子を含む特許請求の範囲第25項のプラスミド。

27) 特許請求の範囲第26項記載のプラスミドで形質転換された真核細胞。

28) 前記細胞がCHO細胞である特許請求の範囲第27項記載の細胞。

29) プラスミド pRK1-4。

30) 生産物遺伝子を含む特許請求の範囲第29項記載のプラスミド。

31) 特許請求の範囲第30項記載のプラスミドにより形質転換された真核細胞。

32) 前記細胞がCHO細胞である特許請求の範囲第31項記載の細胞。

33) 免疫グロブリンエンハンサーを含む特許

17) 補助DNAが更にトランス作動性転写活性化因子のための野生型プロモーターを含む特許請求の範囲第7項記載のベクター系。

18) 遺伝子がE1AポリオマラーJ T抗原、SV40ラージT抗原またはmyc遺伝子である特許請求の範囲第6項記載のベクター系。

19) トランス作動性転写活性化因子遺伝子が、生産物遺伝子および/または選択遺伝子を含むベクターに結合していない特許請求の範囲第18項記載のベクター系。

20) 生産物遺伝子がヒト組織プラスミノゲン活性化因子をコードする、特許請求の範囲第1項記載のベクター系。

21) 形質転換に適した条件下で、生産物遺伝子と補助遺伝子とから成り真核細胞中に異種DNAを導入するためのベクター系を真核細胞中に導入することから成る方法。

22) 細胞がミエローマ細胞である特許請求の範囲第21項記載の方法。

23) 特許請求の範囲第21項の方法により作

請求の範囲第1項記載のベクター系。

34) 特許請求の範囲第33項記載のベクター系を含む細胞。

35) 細胞がミエローマ細胞である特許請求の範囲第34項記載の細胞。

36) SV40エンハンサー、アデノウイルス主後期プロモーター、アデノウイルス3部分リーダー、SV40ポリアデニル化サイト、およびアデノウイルスVA遺伝子を含む細菌プラスミドから成る特許請求の範囲第1項記載のベクター系。

37) 前記細菌プラスミドが複製のSV40オリジンから成るベクター系。

38) 前記細菌プラスミドがイントロンを形成する3'および5'切り継ぎサイトを含む特許請求の範囲第36項記載のベクター系。

39) 前記細菌プラスミドが、生産物遺伝子の3'の位置にDHFR 3'非翻訳配列を含む特許請求の範囲第36項記載のベクター系。

40) 前記細菌プラスミドがDHFRを発現でき

る DHFR 転写配列を更に含む特許請求の範囲第 36 項記載のベクター系。

41) 前記 DHFR 転写配列が SV 40 初期プロモーター、SV 40 初期ポリアデニル化サイトおよび DHFR 遺伝子を含む特許請求の範囲第 39 項記載のベクター系。

42) 選択し得る表現型および生産物を発現するように形質転換されており、かつ表現型の発現に基づいて選択するように設計された条件下で細胞集団に培養された真核細胞をサブクローンする方法であつて、この方法が

(a) 集団中の他の細胞に比較して優先的様式で生産物を発現する 1 以上の細胞を細胞集団から取出し、

(b) 表現型の発現における変化に基づいて選択されるように設計された条件下で、選択された細胞を後の細胞集団に培養し、

(c) 後の細胞集団中のその他の細胞と比較して優先的様式で生産物を発現する 1 以上の細胞を後の細胞集団から更に選択する、各工程

48) 工程(4)の条件を、選択し得る表現型の高い発現に基づき選択するように設計する特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

49) 真核細胞が動物細胞またはその細胞株である特許請求の範囲第 46 項記載の方法。

50) 動物細胞が脊椎動物細胞であるかまたは脊椎動物細胞から誘導される特許請求の範囲第 49 項記載の方法。

51) 脊椎動物細胞がチャイニーズハムスターの卵巣細胞の細胞株である特許請求の範囲第 49 項記載の方法。

52) 工程(a)、(b)および(c)を逐次的に繰返す特許請求の範囲第 7 項記載の方法。

53) 後の細胞集団から選択される細胞を、選択遺伝子の増加した発現に基づいて選択するものでない条件下で更に培養を行う特許請求の範囲第 50 項記載の方法。

54) 選択遺伝子の増加した発現に基づいて選択されるものでない条件下で培養した後、工程(a)、(b)および(c)を繰返す特許請求の範囲第 53 項記載

から成る方法。

43) 工程(a)の選択された細胞は複数のクローンであり、各クローンが 1 個の形質転換細胞から増殖される特許請求の範囲第 42 項記載の方法。

44) 工程(a)において、2〜約 500 の細胞クローンが選択される特許請求の範囲第 42 項記載の方法。

45) 複数のクローンを工程(a)で選択し、これらクローンをいつしよにし、工程(b)でいつしよに増殖させ、工程(b)の細胞集団を稀釈し、複数の容器に分配して、予測される統計上の細胞数が容器 1 つ当たり 1 個の細胞となるように各容器に接種し、これらの容器を培養し、最高生産物収率に基づいて容器内に見出されるクローンを選択する特許請求の範囲第 42 項記載の方法。

46) 生産物が選択し得る表現型を与える特許請求の範囲第 42 項記載の方法。

47) 生産物が選択し得る表現型を与えることのない特許請求の範囲第 42 項記載の方法。

の方法。

55) 細胞が選択遺伝子および生産物遺伝子により同時トランスフェクションによつて形質転換される特許請求の範囲第 49 項記載の方法。

56) 表現型が薬剤に対し、または細胞表面マーカーの存在に対して耐性を持つ特許請求の範囲第 42 項記載の方法。

57) 表現型が、形質転換前の細胞によつては利用されない栄養分を代謝する能力である特許請求の範囲第 42 項記載の方法。

58) 同時トランスフェクションされた遺伝子が共有的に結合されていない特許請求の範囲第 55 項記載の方法。

59) 同時トランスフェクションされた遺伝子が、促進因子、促進因子-依存プロモーター、および配列順序でプロモーターの下流に、生産物遺伝子、選択遺伝子およびポリアデニル化サイトを含むベクターに共有結合される特許請求の範囲第 55 項記載の方法。

60) 生産物遺伝子の停止コドンの最後のヌク

レオナドと選択遺伝子の開始コドンの第一のヌクレオチドとが直接に結合している特許請求の範囲第59項記載の方法。

61) 同時トランスフェクションされた遺伝子が共有的に結合されていない特許請求の範囲第55項記載の方法。

62) 生産物遺伝子が、細胞によつて認識される促進因子、プロモーター、およびプロモーターから遠次下流に生産物遺伝子およびポリアダニル化サイトを含むベクター内に存在する特許請求の範囲第61項記載の方法。

63) 促進因子が、プロモーターの5'末端、ポリアダニル化サイトと生産物遺伝子との間、またはポリアダニル化サイトから3'末端に位置している特許請求の範囲第62項記載の方法。

64) 促進因子がウイルス性促進因子である特許請求の範囲第63項記載の方法。

65) 細胞が、促進因子を得たウイルスに対して通常許容性である特許請求の範囲第64項記載の方法。

範囲第42項記載の方法。

73) 生産物が酵素、ホルモン、プロ酵素、酵素阻害剤または酵素活性化因子である特許請求の範囲第42項記載の方法。

74) 生産物がジサルフィド架橋を持つグリコシル化蛋白である特許請求の範囲第42項記載の方法。

75) 生産物が血栓蛋白またはフィブリン加水分解物から選ばれるヒト蛋白である特許請求の範囲第42項記載の方法。

76) 蛋白が組織プラスミノゲン活性化因子である特許請求の範囲第75項記載の方法。

77) 選択し得る表現型がメソトレキゼートに対する耐性またはヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地中での増殖能力である特許請求の範囲第47項記載の方法。

78) 生産物蛋白を遺伝子的に欠損している実質上同一遺伝子の宿主に工程(4)で選択された細胞を接種することから成る特許請求の範囲第46項記載の方法。

66) 促進因子が非ウイルス性で、真核細胞性の促進因子である特許請求の範囲第63項記載の方法。

67) 促進因子が免疫グロブリン促進因子であり、細胞が免疫グロブリン分泌するミエローマ細胞ラインである特許請求の範囲第66項記載の方法。

68) ベクターがウイルス性の複製オリジンを含まない特許請求の範囲第62項記載の方法。

69) 促進因子がサルウイルス40、ポリオマウイルス、牛パピローマウイルス、アデノウイルス、ラウス肉腫ウイルスまたはヘルペシプレックスウイルスから得られる特許請求の範囲第64項記載の方法。

70) 促進因子がベクター中に反復して存在する特許請求の範囲第62項記載の方法。

71) 促進因子反復が直列である特許請求の範囲第70項記載の方法。

72) 細胞が生産物を発現する優先的様式が多量かつ高活性の生産物の発現である特許請求の

79) 細胞がヒト幹細胞である特許請求の範囲第78項記載の方法。

80) 最高活性および最多量の生産物を生産する細胞について細胞集団中の少くとも一部の細胞を検定し、それら細胞の標本の染色体DNAを生産物遺伝子と交雑できる標識化DNAプローブで標識化し、標本の染色体を観察し、生産物をコードするDNAが、前記細胞集団中の他の細胞に比較して比較的少ない染色体サイト中に見出される細胞を選択することから成る特許請求の範囲第42項記載の方法。

81) 染色体の特徴が形質転換前の細胞の染色体の特徴に最も似ている細胞を選ぶことにより細胞を選択する特許請求の範囲第42項記載の方法。

82) 前記特徴が染色体の長さであり、二重微小染色体、破断染色体または転座染色体を含む細胞を選択しない特許請求の範囲第81項記載の方法。

3.〔発明の詳細な説明〕

発明の背景

本発明は真核細胞による興味ある蛋白質の産生に関する。特に、蛋白質および選択しうるマーカーをコードする遺伝子で形質転換された真核細胞培養物から分泌された商業的に有用な蛋白質を高収量で得ることに関し、より詳細には蛋白質の発現を高める補助DNA(accessory DNA)と関連させて蛋白質をコードする遺伝子を含む形質転換ベクターに関する。

次の定義は本発明の理解を容易にするために提供される。当技術分野で流通している意味から少しはずれた程度にまで下記の定義は及ぶべきである。

増幅(amplification)は細胞がそれらの染色体DNA内で遺伝子複製を生ずる過程を意味する。

同時形質転換(cotransformation)は細胞にとって異質の1つ以上の外来性遺伝子(そのうちの1つは選択しうる表現型を細胞に付与する)で細胞を形質転換する過程を意味する。

は治療上有用であるような望ましい特性を有する蛋白質産物をコードする遺伝子のことである。

遺伝子型(genotype)は表現型として観察されるその発現に対立するものとして細胞内に包含される遺伝情報を意味する。

結合(ligation)は2つのDNA鎖の5'末端と3'末端との間にホスホジエステル結合を形成する過程を意味する。これはT4 DNAリガーゼによる平滑末端の結合を含むいくつかのよく知られた酵素的操作により達成される。

方向性(orientation)はDNA配列におけるヌクレオチドの順序を意味する。DNA配列の反対の方向性は、他の配列に関してその配列の5'-3'順序が、その配列が得られたDNAの基準的に比較した場合反対になつていものである。この種の基準点にはDNA源における他の特定のDNA配列の転写方向またはその配列を含む複製可能なベクターの複製開始点が含まれる。

転写(transcription)はDNA鋳型からのRNAの合成を意味する。

下流(downstream)はヌクレオチド配列の3'末端の方へ行く方向を意味する。

促進因子(enhancer)は遺伝子の本性、遺伝子に対するそのヌクレオチド配列の位置またはその配列の方向性とは無関係に遺伝子の転写を増強することができるヌクレオチド配列のことである。

遺伝子は目的の成熟蛋白質をコードするデオキシリボヌクレオチド配列である。本明細書においては、遺伝子はRNA転写開始信号、ポリアダニレーション付加部位、プロモーターまたは促進因子のような翻訳されない側面領域(flanking region)を含まないだろう。

選択遺伝子(selection gene)は検出できる蛋白質として遺伝子を発現する細胞に表現型を付与する遺伝子のことである。

選択因子(selection agent)は選択遺伝子の発現を検出可能にする条件または物質である。

表現型(phenotype)は細胞の遺伝子型により発現した細胞の観察しうる諸性質を意味する。

生産物遺伝子(product gene)は診断上また

形質転換(transformation)は細胞が外来性DNAを取り込むことにより細胞の遺伝子型を変化させることを意味する。形質転換は一時的であるかまたは安定であつて、いくつかの場合には細胞の表現型の変化により検出できる形質転換された細胞は形質転換体と呼ばれる。前形質転換細胞は母細胞と称される。

翻訳(translation)はメッセンジャーRNAからのポリペプチドの合成を意味する。

真核細胞へのDNAの導入は一般によく知られた方法であり、各種の標準方法により達成することができる。これらにはプロトプラスト融合、DNAの微小注射、染色体トランスフェクション、溶菌および非溶菌ウイルスベクター〔例えば、Mulliganらの"Nature"(ロンドン)277:108~114(1979)〕、細胞-細胞融合〔Fournierらの"Proc.Nat.Acad.Sci."74:319~323(1977)〕、脂質構造(米国特許第4394448号)およびDNA沈殿物の細胞エンドサイトーシス〔Bachettiらの"Proc.Nat.Acad.Sci."74:

1590~1594(1977))の使用が含まれる。

細胞は一時的にDNAを取り込むことができるか、またはそのDNAは取り込まれて諸条件に応じて安定な細胞系列を産生することができる。安定な細胞系列を得るための1つの方法は、目的の蛋白質遺伝子を含むDNAとともに選択遺伝子を挿入し、そしてその細胞系列を選択圧力下に保持することである。いずれにしても、形質転換された細胞からの蛋白質の発現を高める方法を見つけることが望ましい。

発明の要約

本発明は真核細胞内での異種蛋白質の発現を高める手段を提供する。本発明によれば、真核細胞内で異種蛋白質の発現を高める方法は、真核細胞内に異種の非ウイルス性蛋白質をコードするDNAおよび補助DNAを導入し、そしてその細胞を培養して前記蛋白質を発現させることから成っている。本発明はまた異種の非ウイルス性蛋白質を発現させるべく真核細胞内で使用するための補助DNAを含む形質転換用ベクターを提供することである。

り認識される諸機能を含む。こうして、補助DNAは形質転換において以前に用いられた単なるキャリアーDNAまたは嵩高DNA以上のものである。

補助DNAの1つの部類は翻訳活性化因子をコードするDNAからなる。翻訳活性化遺伝子は蛋白質、または翻訳の効率を高めるように生産物のためのメッセンジャーRNAと相互に作用する短い非翻訳RNA産物を生ずる。1つの例はウイルスに関係のある(VA)RNAをコードするアデノウイルスDNAである(Thimmappayaらの"Cell" 31:543~551(1981))。このDNAは小型の非翻訳RNAの2つの物質(VA1およびVA2)を生産する。VA DNAのRNA産物は目下のところ不確かな方法でアデノウイルスの主後期プロモーター(major late promoter)の3部分リーダー配列と関係して、そのリーダー配列を含むmRNAからの翻訳を高めると考えられる。VA RNAはまた他の初期アデノウイルスmRNAの翻訳可能性を高める(SvenssonおよびAkusjaruの"MoI. Cell Bio." 4:736~742(1984))。VA1またはVA2 DNAはよく

好適な実施態様においては、増幅しうる選択可能な表現型を発現する遺伝子が真核細胞内に導入されて、目的の異種蛋白質をコードする導入DNAおよび補助DNAの増幅が促進される。

発明の詳細な記述

本発明によれば、補助DNAおよび目的の蛋白質をコードするDNA(すなわち生産物遺伝子)が真核細胞内に導入される。補助DNAは意図する蛋白質の発現を高める。例えば、補助DNAは転写または翻訳の効率を増加させるか、または目的の蛋白質の発現を高めるための他の作用をもつことができる。

本発明によれば、補助DNAは形質転換用ベクター系の一部分である。それは目的の異種蛋白質をコードするDNAの導入前に、導入と同時に、あるいは導入後に細胞内に導入される。補助DNAは形質転換された細胞系列により合成される生産物の安定性を改善し、その細胞系列内に導入された外来性遺伝子の増幅を高め、また転写もしくは翻訳の効率を増すDNAである。補助DNAは母細胞によ

知られている。それは、そのプロモーターとともに、連鎖ベクター内に(好ましくは生産物遺伝子のプロモーターから上流またはポリAデニレーション部位から下流に)直接結合されるか、あるいは生産物遺伝子または選択遺伝子へ結合されないままにトランスフェクトされてもよい。

VA RNAにより高められた翻訳は、後期アデノウイルスmRNAの3部分リーダー構造がそのmRNAに存在する場合、最も劇的である。

補助DNAのもう1つの部類は母細胞からの真核細胞ゲノム性DNAを含む。このDNAは複製開始点またはDNAの安定性を促進する配列を含むと考えられるが、この種のDNAの有益な作用をうながすそのメカニズムは知られていない。このDNAは細胞系列のゲノム性DNAをランダムに切断するかまたはエンドヌクレアーゼで消化することにより得ることができる。ゲノム性補助DNAは大きさが約50~5000塩基対の断片からなるべきである。これらの断片はその後形質転換用ベクターのプロモーターから上流(好ましくはいずれの促進因子か

らも上流)またはポリアデニレーション部位から下流の利用しうる制限部位で結合させる。こうしてこれらのベクターは形質転換に適するものとなり、この後形質転換体は1つまたはそれ以上の望ましい特性(例えば、形質転換体の段階的培養後の生産物合成の安定性および/または生産物の高収量)について選別される。

形質転換体からの生産物の収量は、トランス-作働性転写活性化因子と名づけた1部類の補助DNAで細胞を形質転換することにより改善できる。この種のDNAは転写を刺激する蛋白質または蛋白質誘導体をコードする。転写活性化因子の1つの部類はそれらが無限の連続した子孫形成を可能にするので不滅性遺伝子と称され、この種の遺伝子を含む細胞は所定の数の分裂後も死滅しない。これらの活性化因子は転写速度を増すために生産物遺伝子と同じDNA領域内に結合される必要はなく、この点においてこれらは促進因子と異なる(Imperialeらの"Cell" 35:127~136(1983)、Greenらの"Cell" 35:137~148(1983))。

生産物遺伝子の例は、血液凝固性または線維素溶解性蛋白質(例えば抗血友病性因子、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼおよび凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、ⅩまたはⅪ)、血液蛋白質(例えばフィブロンクテンまたはアルブミン)、プロテアーゼ阻害因子(例えば抗トロンビンⅢ、アルファ-1-抗トリプシンおよび2マクログロブリン)、ホルモンまたは調節蛋白質(例えばエリスロポエチンおよび他のT-細胞活性物質などのリンフォカイン、成長ホルモンおよび血小板誘導成長因子)、腫瘍遺伝子産物、細胞表面抗原、免疫蛋白質(例えばIgG、IgEおよびIgM)および補体、ならびに他の商業上興味ある蛋白質をコードする遺伝子である。

形質転換用ベクター

本発明による形質転換に用いるベクターは一般に補助DNAと生産物遺伝子とを含むだろう。さらに、形質転換用ベクターには通常促進因子、プロモーター、イントロン、ポリアデニレーション部位および以下で述べる3'非コード領域などの他の

本発明で用いる数種のトランス-作働性転写活性化因子はそれら自体既知であつてクローン化されている。最も広く研究された例にはヒトC-myc、SV40大型T抗原、ポリオーマ大型T抗原およびアデノウイルスE1A遺伝子が含まれる。

使用することができる生産物遺伝子は本質的に無限である。蛋白質をコードする遺伝子、または酵素転化のような蛋白質に基づいた反応により作ることができる物質をコードする遺伝子が適当である。毒素を合成するかまたは宿主蛋白質を加水分解することによつて宿主細胞に悪影響を与える蛋白質(例えば原核細胞または下等な真核細胞源からのいくつかの酵素)をコードする遺伝子は、例えば抗毒素を培地に加えるかまたは最適と思われるより低い発現レベルを選択するなどの制限を加えて使用することができる。活性を示す蛋白質または酵素の遺伝子は、哺乳動物または脊椎動物などの高等動物の細胞内に見出される。大抵の治療用蛋白質をコードする興味ある遺伝子はこの部類に属するだろう。

要素が存在するだろう。選択遺伝子を用いる場合、それはベクター内の生産物遺伝子へ結合されるか、またはその生産物遺伝子を含むベクターと同時形質転換される別のベクター内に存在することができる。

選択遺伝子は3つのカテゴリー:検出可能に増幅される選択遺伝子、優性の選択遺伝子、および検出可能に増幅される優性選択遺伝子に区分される。

検出可能に増幅される選択遺伝子は、宿主細胞を選択因子へさらすことにより増幅を検出し得るものである。検出可能に増幅される非優性遺伝子は一般に遺伝子型として選択遺伝子を欠く母細胞系列を必要とする。例としてはアスパラギンシンセターゼ;アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ[Kempらの"Cell" 9:541(1976)];アデニル酸デアミナーゼ[DeBatisseらの"Mol and Cell Biol." 2(11):1346~1353(1982)];アデノシンデアミナーゼ[YeungらのJ.B.C. 258:15185(1983)];マウスジヒドロ葉酸

レダクターゼ (DHFR) およびマウスチミジンキナーゼ (TK) (欠損プロモーターをもつ) をコードする遺伝子類が含まれる。

優性の選択遺伝子は母細胞の遺伝子型にかかわらず形質転換体において発現されるものである。大抵の優性選択遺伝子は検出可能に増幅されない。というのはその表現型が選択因子を処理するのに非常に効果的であるので、その遺伝子を増幅した細胞系列と増幅しなかつた細胞系列とに識別するのが困難であるからである。この型の優性選択遺伝子の例はキサンチン-グアニン ホスホリボシントランスフェラーゼ [Mulliganらの "Proc. Nat. Acad. Sci." 78(4): 2072~2076 (1981)] およびアミノグリコシド-ホスホトランスフェラーゼ [Colbere-Garapinらの "J. Mol. Biol." 150: 1~14 (1981)] などの原核動物の酵素をコードする遺伝子類である。

いくつかの優性選択遺伝子はまた検出可能に増幅される。適当な例にはHaberらの "Somatic Cell Genet" 4: 499~508 (1982) に記載

された突然変異 DHFR 遺伝子、HLA 抗原のような細胞表面マーカー、および当技術分野で知られた蛍光原または色素原基質から蛍光産物または着色産物を生ずる酵素 (例えば特異なエステラーゼ類) をコードする遺伝子が含まれる。

本発明においては検出可能に増幅される優性の選択遺伝子を使用するのが好ましい。いくつかの場合の優性選択遺伝子は、その遺伝子内での適当な突然変異によつて、検出可能に増幅される遺伝子に転化できると理解すべきである。

選択因子は選択遺伝子の不存在下で細胞増殖を抑制するものであるのが好ましい。こうして、選択遺伝子 (および恐らくは生産物遺伝子) を欠くか、またはその選択遺伝子をもはや発現しない長期培養の復帰突然変異細胞はその集団を増殖し過ぎることがないだろう。しかしながら、治療目的のための蛋白質産物の商業的生産においては、細胞毒素の使用を避けてその産物の精製工程を簡単にすることが望ましいだろう。それ故、望ましい選択遺伝子は、形質転換体が選択遺伝子を欠く場

合に用いることのできない増殖にとつて不可欠な栄養素を形質転換体で使用させ得るものであるだろう。1つの例としては先に述べた TK 遺伝子がある。

選択遺伝子はまた生産物遺伝子であり得ることに留意すべきである。例えば、治療剤または診断剤として使用するための選択遺伝子の生産物を収獲することが望まれる。生産物遺伝子は、もし形質転換体の環境が変更されてその生産物が形質転換体にいくつかの選択利益を付与することができるならば、選択遺伝子として機能することができるようになるだろう。例えば、生産物遺伝子は細胞培地中の他の方法では使用できない不可欠な基質に作用してその不可欠な基質 (例えば必須栄養素) を放出させる酵素を産生することができる。

ここで用いる選択遺伝子および生産物遺伝子はそれらの野性型の翻訳されない側面配列の全てまたは一部分を同伴してもよいが、通常この種の配列は以下で述べるように同伴されないだろう。連鎖ベクターの場合に、生産物収量の特に有益な結

果は選択遺伝子の翻訳領域から上流でかつこの領域に接近して生産物遺伝子を位置させることにより得られる。このことは一般に野性型生産物遺伝子から下流に見出される 3' 非翻訳領域および野性型選択遺伝子から上流に見出される 5' 非翻訳領域の全部でなくとしても大部分が適当な制限エンドヌクレアーゼによつて切断されるか、あるいは本明細書の他の処で示す M13 でのオリゴヌクレオチドプライミングを経る欠失によつて切断されることを意味している。その結果、両方の遺伝子は生産物遺伝子と選択遺伝子との間にプロモーターが挿入されることなく直接結合される。

ここで用いる遺伝子は一般に成熟生産物の構造、安定性および/または分泌にとつて望ましいプレプロ-ポリペプチド (例えば分泌リーダー) をコードする野性型翻訳配列を含むだろう。しかしながら、野性型の翻訳リーダー配列が形質転換体内で適切に作用しない場合には、この種のプレプロ配列はベクターへの組み込みおよびその後の宿主細胞の同時形質転換以前に欠失されるか、またはベ

クター内で適切に作用する他のプレプロ配列によつて置換されてもよい。

一般に、ベクターまたはベクター内に含まれる遺伝子がイントロンで中断されることは、ベクターからのメッセンジャーRNA転写物が形質転換体によつて適切に切り出されて成熟蛋白質および目的のリーダー配列へ翻訳されるメッセンジャーRNAを生ずる限り、重要なことでない。これは他の高等真核細胞によりプロセッシングされるはずの所定の高等真核細胞の遺伝子に見出されるイントロンの場合であるだろう。ここで用いる大部分の遺伝子はcDNA逆転写物であるのでイントロンは全く存在せず、まちがった転写後切り出し(post-transcriptional splicing)の可能性は相当減少するだろう。

連鎖ベクターの場合、選択遺伝子および生産物遺伝子のためのコード鎖は生産物遺伝子の停止コードを選択遺伝子の開始コードへ直接結合することによつて接合されるのが好ましい。これとは別に、これらの両遺伝子はグアニンデオキシリボス

クレオチド(G)およびシトシンデオキシリボスクレオチド(C)に富むオリゴデオキシリボスクレオチド橋を介して結合される。この橋はRNAヘアピンループの形成可能性を減ずるために、終止コードおよび開示コード、ならびにパリンδροーム構造(palindrome)を含まない方がよい。

“生産物遺伝子”および“選択遺伝子”という用語は、ただ1個の各遺伝子または単一の各遺伝子コピーのみがベクター内で使用されるということの意味するものではない。第一に、所定の選択表現型は1つ以上の別個の蛋白質の合成を必要とするかも知れない。この場合、例えば各蛋白質の選択遺伝子は生産物遺伝子または他のどの選択遺伝子にも共有結合で結合されないベクター内に存在するだろう。また各選択遺伝子は先に述べたとくまたは米国特許第4399216号に記載されるところで生産物遺伝子へ結合されるだろう。各選択遺伝子が他のどの選択遺伝子とも無関係に同じ選択因子のための選択表現型を与える場合、1個以上の選択遺伝子を使用することは好ましくない

だろう。

別個の生産物遺伝子を複数含む1つまたはそれ以上のベクターを用いて形質転換するのが望ましいかも知れない。互いに有益な作用をもつ蛋白質をコードする別個の生産物遺伝子は特に興味をもたれる。例えば、他の蛋白質産物を安定化する蛋白質、または生物学的に活性な作用をもつ多重蛋白質系の一部をなす蛋白質を同時発現させることができる。

さらに、選択遺伝子および生産物遺伝子のいずれか一方または両方は1つまたはそれ以上のベクター内で反復されてもよく、すなわち多重の、一般にはタンデム(直列)のコピーで存在し得る。このような場合に、反復された遺伝子は各々ただ1個の遺伝子コピーのみを含むベクター内に存在するRNAプロセッシングおよび転写制御配列の全てを含むのが有利である。

ベクターはまた促進因子を含むことができる。促進因子はプロモーターと機能的に異なるが、プロモーターと協力して作用すると思われる。細胞

レベルでのそれらの機能は十分理解されていないが、それらの特異な性質は位置や方向性に関係なく転写を活性化させまた増強させるその能力にある。プロモーターは遺伝子の上流に存在する必要がある。一方促進因子はプロモーターから上流すなわち5'方向に、イントロンとして遺伝子内に、または遺伝子とポリアデニレーション部位との間の遺伝子から下流すなわちポリアデニレーション部位から3'方向に存在していてもよい。逆転プロモーターは機能的でないが、逆転促進因子は機能的である。促進因子はシス-作用性である。すなわちそれらが同一DNA分子に存在する時のみプロモーターに効果を及ぼす。促進因子の一般的概論についてはKhouryらの“Cell” 33: 313~314(1983)を参照されたい。

好適な促進因子はシミアンウイルス40、ポリオマウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、レトロウイルスまたはアデノウイルスのような動物ウイルスから得られる。理想的には、促進因子は宿主細胞が許容するウイルス、すなわち通常宿主型の細胞に

感染するウイルスからのものである方がよい。ウイルス性促進因子は公然と入手できるウイルス類から簡単に得ることができる。例えば、ラウス肉腫ウイルスやシミアンウイルス40のような数種のウイルスの促進因子領域はよく知られている。Luciwらの“Cell” 33: 705~716(1983)を参照されたい。問題のウイルスの公表された制限地図に基づいてこれらの領域を切り取り、必要に応じてそれらの部位を修飾して生産物遺伝子または選択遺伝子のベクター内にその促進因子をつなぎ合わせることは慣用的な化学手段であるだろう。例えば、KaufmanらのMol. Cell Biol. 2 1304~1319頁(1982)を参照されたい。別の方法として、促進因子は配列データから合成することができる。ウイルス性促進因子の大きさ(一般に約150塩基対以下)は十分に小さいので、これは実際に達成できるだろう。

促進因子はタンデム型(自然界に見出せるSV40ウイルス性促進因子を用いる場合)で、または先に論じた部位でベクター全体にわたり分離し

部位または転写プライマー配列)のどれも含む必要はない。しかし、これらの配列の欠失を可能にする制限酵素部位が存在しない時にはこれらの配列の全てまたは一部分を組み入れる方が都合がよい。また、促進因子とその促進因子の野性型制御下にあるプロモーターとの両方を含むDNA断片を使用することはさらに都合がよいだろう。

促進因子および促進因子-プロモーター領域はウイルスよりもむしろ真核細胞から選択することができる。これらは原細胞内で大きな構成量の蛋白質を産生する遺伝子と関連した促進因子であるのが好ましい。それらは野性型環境において通常制御される遺伝子以外の遺伝子から高収量の生産物を同様に産生することを見出された。形質転換しようとする宿主細胞は好適には促進因子が得られた細胞と同じ体細胞系列または生殖細胞系列である。例えば、Jk-Ckイントロン内の免疫グロブリン遺伝子を活性化または促進する領域(免疫グロブリン促進因子)は生産物遺伝子の上流または下流に導入され、そしてこの構成物は骨髓腫細胞

ベクター内に反復させることができる。好ましくは、促進因子は野性型原においてその影響下にある遺伝子に関してそれがもつていた方向性と同一方向性を生産物遺伝子および/または選択遺伝子に関してもつ。促進因子はベクター内に存在する全てのプロモーターから上流に位置するのが好適である。複数の異なる促進因子を用いてもよく、また促進因子は形質転換の際に役に立つために生産物遺伝子または選択遺伝子へ結合される必要はない。非連鎖ベクター系において、促進因子は生産物遺伝子を含むベクターに存在することが好ましい。これは生産物遺伝子および選択遺伝子が同時形質転換体内で物理的に結合される可能性を増すだろう。この型においては所定量の形質転換DNAに対して約1~100倍以上の形質転換体を、選択遺伝子の転写に用いられるプロモーターに応じて、得ることができる。

促進因子はその野性型環境に見出せる側面配列(例えばウイルスの複製開始点、TATAボックスのような関係のあるプロモーター成分、キャップ

系列内へ選択遺伝子とともに導入される。この促進因子についての詳細はGilliesらの“Cell” 33: 717~728(1983)を参照されたい。免疫グロブリン促進因子は蛋白質産物を産生させるための骨髓腫細胞内に挿入される予定のベクターにおいて用いられるのが有利である。

生産物遺伝子および選択遺伝子は共にプロモーターの転写制御下におかれるようにプロモーターへ結合されるだろう(ただし先に述べた連鎖ベクターの場合を除く)。プロモーターは問題の遺伝子のための野性型プロモーターであつてもよく、また遺伝子は他の真核細胞系列または原核生物ウイルスからの形質転換細胞系列内で他の遺伝子からのプロモーターへ結合されてもよい。明らかに、そのプロモーターは形質転換細胞内のプロモーターとの偶発的組み換えなしに形質転換しようとする宿主によつて認識されるべきであるが、その他の場合はプロモーターの選択は限定的であると考えない。特に望ましいプロモーターは5'非翻訳リーダーへ結合されて、外来性の因子または条

件〔例えば補助遺伝子産物（転写物およびポリペプチド）、重金属イオン、熱による衝撃またはウイルス感染〕により転写的にまたは翻訳的に活性化される。生産物遺伝子発現に与つて好適なプロモーターは3部分リーダーをもつアデノウイルスの主後期プロモーターである。

ベクター系は、促進因子と無関係のプロモーター（例えばマウスアルファグロブリンのためのプロモーター）が選択される場合に、促進因子を含む必要はない。しかし、この種の促進因子-非依存性の強力プロモーターよりもむしろ促進因子と促進因子-依存性の強力プロモーター（例えばアデノウイルス主後期プロモーター）とを含むベクターが使用される。強力プロモーターは制御された条件下でSV40の初期プロモーターと同じかまたはそれより多い転写物をもたらすものである。

ベクター内に存在する方がよい他の要素はポリアデニレーション部位である。これは遺伝子の翻訳領域から下流に位置するDNA配列であつて、その遺伝子にアデニンリボヌクレオチドが付加して

メッセンジャーRNAの3'末端にポリアデニレート（尾）を形成する。ポリアデニレーションは細胞の分解、メッセンジャーRNAのレベルおよび蛋白質産物のレベルを低下させる現象に対してメッセンジャーRNAを安定化させるのに重要である。

真核細胞のポリアデニレーション部位はよく知られている。コンセンサス（consensus）配列が真核細胞遺伝子の間に存在する：ヘキサヌクレオチドの5'-AAUAAA-3'はポリアデニレーションが起るRNAの1つの点から11-30ヌクレオチドのところに見出される。ポリアデニレーション部位を含むDNA配列は発表された報告書に従つてウイルスから得ることができる。ポリアデニレーション配列の例はマウスベクターグロブリン、シミアンウイルス40の後期または初期領域遺伝子などから得られる。ウイルスのポリアデニレーション部位の方が好ましい。これらの配列は知られているので、インビトロで合成して慣用方法でベクターへ結合させることができる。

ポリアデニレーション領域は連鎖または非連鎖

ベクター内で生産物遺伝子から下流に位置するべきである。非連鎖ベクターにおいてはそれは場合により選択遺伝子から下流に結合される。ポリアデニレーション部位を翻訳停止コドンから分離する配列は好ましくは促進されない真核細胞遺伝子のような非翻訳DNA領域である。オリゴヌクレオチドは停止コドンからポリアデニレーション部位まで相当な距離（約1000塩基以下）を延びるのが好ましい。この3'非翻訳ヌクレオチド配列は一般に生産物の収量を増加させる。ベクターはコンセンサス配列から約30塩基対下流から終るが、野生型環境内でポリアデニレーション部位から下流に見出せる3'配列を保持することが有利である。これらの配列は一般にポリアデニレーション部位から下流へ約200-600塩基対延びる。

ベクターの非翻訳、転写部分にイントロンが存在すると生産物の収量が増加するのがわかつた。この種のイントロンは宿主細胞または遺伝子源以外の他の源から得てもよい。例えば、アデノウイルス主後期転写物の非翻訳領域内にこの転写物の

ノーマルイントロンの一部分の代わりに挿入された免疫グロブリン遺伝子からの3'スプライス部位は、生産物の収量増加をもたらすことができる。

転写活性化因子、翻訳活性化因子、および強力プロモーターまたはプロモーターと促進因子との組合せによつてトランスフェクトされた細胞は最も高められた生産物合成を提供する。カスケード作用はこの転写および翻訳活性化因子-形質転換細胞から生ずるだろう。

ベクターは好適にはスーパーコイル状の二本鎖環状構造物であるだろう。これはベクターが標準原核生物クローニング法（この方法によつてベクターは作られる）から得られる形体である。しかし、ベクターは線状化されていてもよく、すなわちゲノム性補助DNAへの結合のような他の工程に付随して、ある1つの点で共有結合的に切断されていてもよい。

次の表は適当な形質転換用ベクター系の代表的な例である。

表 1

1. $\boxed{E_n - VP - Pd - S - p(A) - R}$
2. $\boxed{E_n - VP - Pd - p(A) - R}$; $\boxed{VP - S - p(A) - R}$
3. $GF - E_n - VP - Pd - p(A) - R - GF$;
 $GF - S - p(A) - R - GF$
4. $GF - EP - Pd - p(A) - GF$; $\boxed{EP - S - p(A) - R}$
5. $\boxed{VP - TTA - p(A) - R}$; $\boxed{E_n - VP - Pd - p(A) - R}$,
 $\boxed{EP - S - p(A) - R}$
6. $\boxed{VP - TTA - p(A) - R}$; $\boxed{E_n - VP - Pd - p(A)}$,
 $\boxed{EP - S - p(A)}$
7. $\boxed{VP - TLA - p(A) - R}$;
 $GF - TTA - E_n - VP - Pd - p(A) - GF$; $\boxed{EP - S - p(A) - R}$
8. $\boxed{E_n - VP - I - Pd - p(A) - R}$; $\boxed{VP - S - p(A) - R}$;
9. $\boxed{TLA - p(A) - R}$; $\boxed{VP - TTA - p(A) - R}$;
 $\boxed{E_n - VP - I - Pd - p(A) - R}$; $\boxed{EP - S - R}$.
10. $\boxed{E_n - VP - I - Pd - S - TLA - p(A) - R}$
11. $\boxed{EP - Pd - B - S - E_n - p(A) - R}$; $\boxed{VP - TLA - p(A) - R}$

GF = 真核細胞ゲノム性断片

I = 外来性イントロン

R = 複製成分 (合成ベクターからのプラスミドまたはバクテリオファージ残部)

$\boxed{}$ = プラスミドのような環状 DNA 配列を示す。

ベクター合成

生産物遺伝子と選択遺伝子との間に短いオリゴヌクレオチド配列をもつか、あるいはこれらの間にオリゴヌクレオチド配列をもたない連鎖ベクターは、数種の方法で作ることができる。生産物遺伝子の翻訳停止コドンに隣接して、あるいはそこから下流の一番近いところに制限部位が存在しない場合、生産物遺伝子は野性型翻訳停止コドンの上流の制限部位で切断され、その後そのコドンは合成結合剤を用いて選択遺伝子断片へ結合される。このようなベクターの別の作成方法は、架橋ヌクレオチドプローブを使用して生産物遺伝子と選択遺伝子との間にある望ましくない配列を欠失させることである。もう 1 つの方法として、蛋白質産

$$12. \boxed{E_n - VP - Pd_1 - Pd_2 - S - p(A) - R}$$

$$13. \boxed{TLA - VP - Pd - S - p(A) - R}$$

$$14. GF - TLA - VP - TTA - p(A) - R - GF - E_n - VP - Pd - I - p(A) - R - GF$$

$$15. \boxed{TLA - R}$$
 ; $\boxed{VP - I - Pd - p(A) - R}$;
 $\boxed{E_n - S - p(A) - R}$

EP = 真核宿主細胞によつて認識される非ウイルスプロモーター

VP = 真核宿主細胞によつて認識されるウイルスプロモーター

TTA = トランス-作動性転写活性化因子

E_n = 促進因子

TLA = 翻訳活性化因子

p(A) = ポリアデニレーション部位

Pd = 生産物遺伝子

S = 選択遺伝子

B = オリゴヌクレオチド橋

-- = ホスホジエステル結合

; = 非結合ベクター成分を表わす

物のカルボキシ末端アミノ酸が生物学的活性に必要なものでない場合、合成終止コドンが便利な 3' 末端へ結合されるだろう。ここで遺伝子断片を使用することは、自然界に見出せるものと出来るだけ同一の蛋白質産物を合成することが望まれるので、好適な実施態様とは言えない。

野性型環境内で選択遺伝子の側面にある 5' 非翻訳領域は、生産物遺伝子について先に述べた方法と同じ方法で除去することができ、これは実施例 4 に示すごとく生産物遺伝子からの欠失と同時に行われる。しかしながら、選択遺伝子またはその誘導体によつて発現される蛋白質は野性型と同一である必要はなく、例えば増殖制限基質に対してより活性であるかまたは野性型蛋白質より毒素に対してより抵抗性であつてよい。連鎖ベクターにおいて、選択遺伝子は生産物遺伝子のプロモーターの制御下にあるのが好ましい。これは、生産物遺伝子を欠く細胞が形質転換体との組み換え現象がない場合に選択因子から生きのびることはできないので、細胞の遺伝子型および蛋白質産物の発

現を安定化するのに役立つだろう。非連鎖ベクターの場合に反対のことが見出されたが、ここでも同じプロモーターを選択遺伝子および生産物遺伝子の両方に使用することができる。

この他に、ここに示すベクターは当技術分野において習熟した者によく知られた技術を用いて合成することができる。生産物遺伝子、選択遺伝子、促進因子、プロモーター、および補助DNA（例えばトランス-作働性転写活性化因子、翻訳活性化因子および類似のもの）などのベクター成分は天然源から得ることができ、また先に述べたように合成することもできる。基本的には、ベクター成分が大量に入手できるDNA中に見出される場合（例えばウイルス機能のような成分）、またそれらが合成可能である場合（例えばポリアデニレーション部位）、大量のベクターは生物源を培養し、そのDNAを適当なエンドヌクレアーゼで消化し、そのDNA断片を分離し、興味ある要素を含むDNAを同定し、そしてそのDNAを当技術分野でよく知られた方法を用いて回収することにより得ること

ターが適当なエンドヌクレアーゼ消化、分子量による分離および形質転換用ベクターの回収により合成ベクターから単離される。形質転換用ベクターの単離は、合成ベクターの残部が真核細胞遺伝子の増幅、転写または翻訳に悪影響を及ぼさない限り、必要ない。例えば、ここで用いる好適な合成ベクターはプラスミドpSR 322の突然変異体であり、これはプラスミドpSR 322中の真核細胞にとって有害な配列が欠失されたものである。LuskyらのNature 293: 79-81 (1981)を参照されたい。この突然変異体の使用は形質転換前にプラスミドの残部を欠失させる必要性を取り除いた。

形質転換

形質転換しようとする細胞は酵母のプロトプラストを含むどの真核細胞であつてもよいが、好適には真菌細胞以外の細胞である。原始的の移植体（幹細胞のような比較的未分化な細胞を含む）、および不滅性のかつ／また形質転換された細胞系列が適している。細胞はその選択遺伝子が、使用され

ができる。一般に、形質転換用ベクターは少量作られ、その後原核生物のプラスミドまたはファージのような自律的に複製する合成ベクターへ結合される。pBR 322 プラスミドは多くの場合に使用できる。Kaufmanらの上記文献(1982)を参照されたい。大きな形質転換用ベクターはコスミド(cosmid; ファージDNAがファージカプシド内に封入されているが、受容宿主へトランスフェクトされた場合プラスミドとして複製するベクター)のような収容能力の高い合成ベクターを必要とするかも知れない。

合成ベクターは慣用方法で、例えば受容原核生物のトランスフェクション、高いコピー数への合成ベクターの複製、細胞溶解による合成ベクターの回収、および当技術分野でよく知られた方法による細胞破片からの合成ベクターの分離によつて、形質転換用ベクターをクローン化するのに用いられる。

得られた合成ベクターは真核細胞内へ直接トランスフェクトされるか、あるいは形質転換用ベク

た時、優性に作用する限りその選択遺伝子を遺伝子型として失う必要がない。

ある実施態様においては、形質転換された安定な細胞系列を必要としない。このような場合に、適当な形質転換用ベクターは哺乳動物細胞内へのDNAの一時的導入に頼ることができる[P. Mellon, V. Parker, Y. Gluzman, T. Maniatis のCell 27: 279-288 (1981)]。目的の形質転換体を単離するために、その集団の全細胞が目的の蛋白質産物を発現する外来性遺伝子を安定に含むことは要求されない。数日間にわたつて目的の生産物を発現するような細胞のサブ集団へ外来性遺伝子を一時的に導入することが可能である。本発明によるDNAのトランスフェクションおよび発現系によつて選択しうるマーカーは形質転換用ベクター内に必要とされないで、外来性遺伝子は1〜2週間にわたる細胞増殖の際に失われる。しかし、適当な哺乳動物細胞のトランスフェクションの2〜3日後に、目的の生産物が合成されたことが見出されそして検出される。

こうして、哺乳動物蛋白質の遺伝子をクローン化するための宿主-ベクター系は、複製開始点-欠損 SV 40 DNA 分子で形質転換された CV-1 サル細胞系列の開発に基づいている〔Y. Gluzman の *Cell* 23: 175-182 (1981)〕。SV 40 はサルの細胞内で細胞溶解的に複製する小型の DNA 腫瘍ウイルスである。DNA の複製がない場合に、SV 40 はサルの細胞を形質転換するだろう。欠損 SV 40 DNA を含む形質転換されたサル CV-1 細胞 (COS と称する) は SV 40 ゲノムの完全なコピーを含まないが、高レベルで大型 T 抗原を産生しかつ SV 40 DNA の複製を許容する。それらはまた初期領域の欠失をもつ SV 40 と SV 40 の複製開始点を含む細菌プラスミドとの複製を効率よく支持する〔R. M. Myers および R. Tjian の *PNAS* 77: 6491-6495 (1980)〕。それ故、この系は外来性 DNA から発現される蛋白質と mRNA のレベルを増加させるために、SV 40 仲介 DNA の複製を経てトランスフェクトされた外来性 DNA (蛋白質遺伝子および補助 DNA) を増幅させる手段を提供する。

産物遺伝子の結合または生産物それ自体の発現についてスクリーニングされる。前者はサザン (Southern) プロット分析を用いて達成され、後者は標準的な免疫検定法または酵素検定法によって達成される。

ひとたび形質転換体が識別されると、一定量または増加量の選択遺伝子の存在下にサブクローニングすることにより生産物遺伝子の発現をさらに増幅する工程が行われる。一般に、これは形質転換体の細胞集団を取り出し、そして (a) その細胞集団の他の細胞に比較した場合により優れた方法で生産物を発現する 1 つまたはそれ以上の細胞をその集団から選択し；(b) 選択した 1 つまたはそれ以上の細胞を、表現型発現における変化によつて選択するように設定した条件下で次の細胞集団へと培養し；そして (c) 工程 (b) からの集団の他の細胞に比較した場合により優れた方法で生産物を発現する 1 つまたはそれ以上の細胞をその集団からさらに選択する；ことを伴う。工程 (b) は工程 (a) からのクローンを多数用いることにより有利に実施され

他の実施態様では、細胞は安定な不変化した哺乳動物細胞系列である。染色体 DNA 内に選択遺伝子を安定して組み込むことが知られている細胞系列が好適であり、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系列である。この他にヒーラ (Hela) 細胞、COS サル細胞、メラノーマ細胞系列〔例えばパウエス (Bowes) 細胞系列〕、マウス L 細胞、マウス線維芽細胞、マウス NIH 3T3 細胞および類似の細胞が有用である。

非連鎖 DNA での形質転換は段階的にまたは同時に行われる。細胞による DNA の取り込みを促進させる方法が知られている。細胞核内へのベクターの微小注射は最高の形質転換効率を生ずるが、磷酸カルシウム沈降物の形の DNA を母細胞にさらすことは一般にもつと都合がよいだろう。生産物を発現する形質転換体の頻度は、選択遺伝子に対してモル過剰の生産物遺伝子 (約 10:1 またはそれ以上) を用いて形質転換することによりさらに高められる。

選択形質転換体はその後それらの染色体内の生

る。この方法は 1983 年 12 月 17 日付の係属中の米国特許出願第 565627 号 (参照によりここに引用される) に詳しく記載されている。

次の実施例は本発明をさらに例示するために提供されるものであり、特許請求の範囲を限定するものではない。実施例において用いられる温度は℃である。

実施例 1

細胞培養

SV 40 形質転換 COS サル細胞 (クローン M6) は M. Horowitz (Horowitz ら, *J. Mol. App. Genet.* 2, 147-9 ページ (1983)) より提供を受けた。アデノウイルス 2 は P. Sharp より提供を受けた。アデノウイルス感染は 37℃ で 90 分間 20 pfu/cell を吸収させる事により実施した。洗浄後、細胞を 37℃ で 18 時間インキュベートした。この時間に著しい細胞症効果が観察された。

DNA トランスフェクションは Sompayrac および Danna により *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78,

7575-8 ページ(1981)に記載されている方法にクロロキン処理(Luthman および Magnusson, *Nuc. Acids Res.*, **11**, 1295-1308 ページ(1983))を加えて実施した。細胞を無血清培地で洗浄し、pH 7.3 の 0.1 M トリスに加えた DEAE デキストラン (NW 5000.000 Pharmacia, 250 mg/ml) および 2 μ g/ml の プラスミド DNA を含有する Dulbecco 改良 Eagle 培地中で 12 時間 37 度でインキュベートする。インキュベーション後、細胞を無血清培地で洗浄し、血清含有培地中 0.1 mM クロロキンで 37 度にて 2 時間処理する。細胞は続いて培地に播種し、指定された時間インキュベートする。

プラスミド構成

アデノウイルス特異的相互作用因子がアデノウイルス MLP に影響しているかを分析するため、一連の DHFR cDNA 遺伝子を構成しており、それらは図 1(a) - 1(e) に示してある。pAdD26SVpA(3) は第 1 のリーダーおよびアデノウイルス後期 mRNA からの 5' スプライス部位を含むアデノウイルス MLP の制御下にあるマウス DHFR cDNA を含有している。

pCVSVL2 は pAdD26SVpA(3) から誘導されるがしかし、pSVod からの SV40 由来物を欠き、アデノウイルス MLP の上流に SV40 エンハンサーおよび複製の起点を含む。pD20 (図 1(c)) および pD17 (図 1(d)) はアデノウイルスファイバタンパク質のための cDNA クローンから誘導されるアデノウイルス第 2 および第 3 の % のリーダーをコードする 138bp DNA 配列 (Zain ら, *Cell*, **16**, 851-61 ページ (1979)) の挿入を除けば pAdD26SVpA(3) (図 1(a)) と同一である。pD20 は 5' スプライス部位に 8bp 5' の PvuII 部位に正しい方向で挿入された 138bp 領域を含む。それ故、pD20 は完全な第 1、第 2 および第 3 の % のリーダーをコードしたスプライスした後期 mRNA からの第 1 の 170bp を含み、第 1 の後期リーダーから 5' スプライス部位へ 8bp を含む。pD17 (図 1(d)) は反対の向きに 138bp フラグメントを含む。pD61 (図 1(e)) は pD20 (図 1(c)) に存在する第 2 および第 3 のリーダー配列を含む点を除いて pCVSVL2 と同一である。

この 5' スプライス部位はマウスイムノグロブリン遺伝子 (Kaufman および Sharp, *Mol. Cell Biol.*, **2**, 1304-19 ページ (1982)) から導入される 5' スプライス部位と適切にスプライスされる。SV40 初期ポリアデニル化信号は DHFR コード領域の 3' 末端に存在する。cDNA 遺伝子は哺乳類細胞の複製に有害な配列 (Lusky ら, *Nature (London)*; **293**, 79-81 ページ (1981)) を欠き、SV40 由来または複製物 (Mellon ら) を含む pBR 322 誘導体 (pSVod) 中にクローンする。

プラスミド pAdD26SVpA(3) (図 1(a)) および pCVSVL (図 1(b)) はすでに記載されている (Kaufman および Sharp, 上記文献)。pCVSVL2 は XhoI リンカーの添加およびアデノウイルス MLP 上流の XhoI 部位 (1583 m.u.) への挿入により導入された重複した SV40 AvaII D フラグメントを含む点を除いて pCVSVL と同一である。SV40 後期プロモーターが Ad2 MLP のように同じ配向をしているごとく両方の AvaIID フラグメントも配向している。

pD17 および pD20, pJAW43 (Zain ら前記文献) を得るため、DNA を XhoI で消化し、DNA ポリメラーゼ I の Klenow フラグメントで処理し、その後 PvuII で消化する。138bp フラグメントを単離し、前もって PvuII で消化した pAdD26SVpA(3) と連結する。DNA を大腸菌 HB101 に移入し、放射性標識した pJAW43 からの 138bp XhoI - PvuII フラグメントでスクリーニングする。陽性のハイブリダイズしたクローンから DNA を調整し、PvuII および HindIII で消化後アクリルアミドゲル電気泳動で向きを検討する。アデノウイルス MLP の転写方向に対して pD20 は 138bp フラグメントを同じ向きに、pD17 はそのフラグメントを逆の向きで含有している。pCVSVL からの EcoRI - XhoI 部分約 1、1KB フラグメントを EcoRI および XhoI で完全に消化した大きな pD20 からのフラグメントに挿入して pD61 を構成する。生成したプラスミド pD61 は SV40 エンハンサーおよび 3 つの部分のリーダーを持つアデノウイルスプロモーターを含有する。

これらの組み換え体はこれらの cDNA 遺伝子の発現に影響を及ぼすアデノウイルス因子の研究のために利用する。実験工程には DNA トランスフェクションおよび COS サル細胞のアデノウイルス重感染が含まれる。DNA トランスフェクションの 36 時間後、トランスフェクトした細胞をアデノウイルスで感染させ、18 時間放置してインキュベートする。その後、細胞を ^{35}S メチオニンで 1 時間標識し、免疫沈降およびポリアクリルアミドゲル電気泳動で DHFR 合成を分析する。結果は AdD26SVpA (3) および pCVSVL2 の両方が偽トランスフェクトした試料に比して DHFR 合成できることを示している。偽トランスフェクトした COS 細胞ではマウス DHFR のすぐ上に移動したサル DHFR を検知することが可能である。

pCVSVL2 および pCVSVL からの DHFR 発現を CHO DHFR 細胞の形質転換により COS 細胞と比べると、2 つのプラスミド間には何の差異も観察されなかった。さらに、アデノウイルスによる重感染も pAdD26SVpA (3) または pCVSVL2 からの DHFR

合成にほとんど効果を示さなかった。しかしながら pCVSVL2 からの発現は pAdD26SVpA (3) の 2 倍以上であつた。これは pCVSVL2 においてアデノウイルス MLP の上流に SV40 エンハンサーが導入された結果である。スプライスしたアデノウイルスの 3 つに分かれたリーダーからの 138bp のリーダー挿入を含むプラスミド (pD20, pD17 および pD61) もまた DHFR を合成する事が観察された。さらに、pD20 および pD61 の両者は、別個の実験において DHFR 合成が 3-10 倍増加する事によりアデノウイルス感染に反応する。反対に、逆方向に 138bp の 3 つに分かれたリーダーセグメントを含む pD17 からの表現はアデノウイルス重感染により影響を受けない。これらの結果は 3 つに分かれた第 2 および第 3 のリーダーセグメント中の配列が方向に依存した様式でアデノウイルス感染に対し反応する事を示唆している。

mRNA レベルがアデノウイルス感染により影響されるかどうかを決定するため、Kaufman らにより Mol. Cell Biol. 2 1304-1319 (1982)

に記載されているごとく 3' S1 マッピングを実施した。3' 末端標識 DNA プローブを合成し、トランスフェクトおよびアデノウイルス重感染した COS サル細胞から単離された全 RNA とハイブリダイズする。プラスミド pCVSVL2、pD20 および pD61 では単一の 550 塩基対フラグメントが観察されそれは SV40 ポリアデニル化部位でポリアデニル化された mRNA に対応する。SV40 エンハンサーを欠く pD20 は SV40 エンハンサーを持つプラスミドに比較して約 2 倍のより低い DHFR 特異的 mRNA を示す。アデノウイルス重感染によつてもどんな cDNA 遺伝子からも DHFR mRNA レベルの変化は認められない。この事はアデノウイルス重感染により観察された DHFR 合成の増加は DHFR mRNA レベルの上昇によるものではない事を示している。アデノウイルス重感染による DHFR 合成の増加は増加した翻訳効率の結果である。

実施例 2

VA RNA の翻訳における効果を分析するため、ヒト ガンマーインターフェロンを発現するプラス

ミドの新しい組 (図 2(a) - 2(d)) を構成した。オリゴ dG-オリゴ dC テーリング法 (Maniatis ら) によりヒト末梢血液リンパ球から単離された mRNA からクローンしたヒト ガンマーインターフェロンをコードしている cDNA は S. Clark 博士 (Genetic Institute) から提供を受けた。ガンマーインターフェロンをコードしている PstI クローンは前もつて SV40 ポリアデニル化信号の PstI 部位 3' を消失させた。pCVSVL2 誘導体の PstI 部位へ挿入する。生じるプラスミド p (ガンマー IF) D-6 (図 2(a)) はガンマーインターフェロンコード領域 DHFR cDNA の 5' および mRNA 統生のための 3' スプライス部位の 3' を含む。3 つに分かれたリーダーを持つ同様のプラスミドを得るため、p (ガンマー IF) D-6 および pD61 の両方を SalI および EglII で消化した。SalI は各々のプラスミドを pBR322 のテトラサイクリン耐性遺伝子内で一度消化し、BglII は各々のプラスミドをイムノグロブリン遺伝子からの 3' スプライス部位のまさしく 5' を一度消化する。p (ガンマ

-IF) D-6 からのガンマー IF 含有フラグメントを3部分リーダーを含むフラグメント pD61 と連結し、続いて DNA は大腸菌 HB101 をテトラサイクリン耐性に形質転換するのに使用する。pL58 (図 2(b)) はアデノウイルスの3つに分かれたリーダーを含むが他の点では p (ガンマー IF) D-6 と同一である。

アデノウイルス VA 遺伝子は HindIII Aa 2B フラグメントから単離され pL58 に導入する。アデノウイルスの HindIII B フラグメント (17.1 mu - 31.7 mu) は前もつて pBR.322 中にクローンし、せなわち 31.7 mu の HindIII 部位を pBR.322 の EcoRI 部位に結合する。このプラスミドを HpaI (28.0 mu) で消化し EcoRI リンカーを加える。EcoRI 消化後、1.4 KB バンドを単離し、pL58 の EcoRI 部位中へクローンする。pQ2 (図 2(c)) はベクター内に VA 遺伝子が存在するが、アデノウイルス MLP と逆の方向に転写する。pQ3 (図 2(d)) は VA 遺伝子が逆の方向性である点を除いて pQ2 と同一である。

ユニット 28.02 および 31.00) が両方の方向に挿入されている点を除いて pL58 と同一である。

COS 細胞における形質転換

プラスミド pQ2、pQ3、pL58 および p-ガンマー IF-6 は各々 COS 細胞にトランスフェクトする (表 1 A)。36 時間後条件付け培地の試料を検定に供し、2つの二重のプレートのうちの1つをアデノウイルスで感染せしめる。感染 20 時間後試料は再びガンマー IF 活性を検定する。p- (ガンマー IF) D-6 は低い活性を示し、アデノウイルス重感染でもわずかに上昇しただけである。pL58 は p6 の数倍の活性を示し、アデノウイルスの感染によりガンマー IF 活性が2倍の増加を示した。反対に、pQ2 および pQ3 の両方ともアデノウイルス重感染なしで、有意に高い水準のガンマー IF 活性 (p (ガンマー IF) D-6 の 50-70 倍) を持っていた。アデノウイルス重感染により、ガンマー IF 活性は減少した。VA RNA がガンマーインターフェンの発現の増加を媒介しているかどうかを決定するため、プラスミド pQ2 および p

ガンマー インターフェロン

ガンマーインターフェン検定は CCL 54 細胞 (ATCC 番号 CCL 54、継代数 24) に対する小胞口内炎ウイルスまたは脳心筋炎ウイルスの細胞症効果からの保護を測定する事により実施する (Stewart, W.E. II, インターフェロン体系, Springer, Berlin, 1979)。テンマーインターフェロン単位は NIH アルファインターフェロン標準品に対して表現した。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼは Corman らにより Mol. Cell Biol., 2, 1044-1051 (1982) に記載されている方法で細胞抽出物から測定した。

ガンマーインターフェロンの発現は VA RNA の定量的効果の感度のよい検定を可能にする。p-ガンマー IF-6 および pL58 は 3' スプライス部位および DHFR cDNA の間の pstI 部位へ適切な方向性でガンマーインターフェロン cDNA が挿入されている点を除いて pD20 および pD61 と同一である。最後に、pQ2 および pQ3 は EcoRI 部位にアデノウイルス VA 遺伝子 (アデノウイルスマップ

(ガンマー IF) D-6 を各々 pSVOd または pVASVOd (アデノウイルス VA 遺伝子を含む pSVOd の誘導体) と 1:1 の比で混合し、COS 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションして 48 時間後、試料はガンマー IF 検定に供した。p (ガンマー IF) D-6 は pSVOd と共トランスフェクトすると活性の 2-3 倍の増加を示した。対照的に、pL58 は pVASVOd との共トランスフェクションにより 10 倍以上の増加を示した。最後に、VA 遺伝子を含む pQ2 は pVASVOd と共トランスフェクションすると高いガンマー IF を持つ。これらの結果はトランス内の VA 遺伝子の存在がアデノウイルス後期 mRNA からの 3つに分かれたリーダーの大多数を含む mRNA からの発現を容易にする。表 1 にみられた pQ3 重感染によるガンマー IF 活性の減少は細胞代謝に対するアデノウイルス感染による毒性効果またはアデノウイルス後期 mRNA と変化した cDNA 遺伝子からの転写物の競合によるものであろう。ガンマーインターフェロン活性を検定した結果は免疫沈降およびプロテインブロッ

ティング両法でも共に支持された(データは示していない)。結果はpQ2がトランスフェクション72時間後1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のガンマーインターフェロンを発現したことを示した。

これらの結果はアデノウイルス重感染による発現の増加にVA RNAが対応している事を確認している。アデノウイルスVA RNAによる翻訳の増加はまたSV40初期プロモーターからのクロラムフェニコールアセチル トランスフェラーゼの発現を増加させる。SV40初期プロモーター制御下細胞クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を含むプラスミドとアデノウイルスVA遺伝子を含むプラスミドの共トランスフェクションではVA遺伝子を欠くプラスミドとの共トランスフェクションに比較して5-10倍高い水準のCAT活性を得る。RNAプロット分析ではVA遺伝子との共トランスフェクションによりCAT mRNAは増加していないので増加した発現は翻訳の増加のためである。SV40初期プロモーターの制御下、細胞キサンテン-グアニンホスホリボシルトラン

スフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドの発現もまたVA遺伝子を含むプラスミドのトランスフェクションにより増加する。

同様に、例えば組織プラスミノゲン活性化因子のごとき他の非定型タンパク質の発現もVA遺伝子のごとき付帯のDNAを用いると著しく増加できる。

SV40ラージT抗原をコードするプラスミドで共形質転換する事によりサルCV1細胞にpL58およびpQ3を導入すると翻訳効率の同様な増加が観察される。このように、翻訳効率の増加はCOS細胞に限定されるわけではない。さらに、内部および分泌(DHFRおよびガンマーインターフェロン)両タンパク質の翻訳をVA RNAで刺激できる。ガンマーインターフェロンcDNA組換え体(pQ2)でトランスフェクトした細胞は、トランスフェクション72時間後、1 $\mu\text{g}/10^6$ 細胞の水準でインターフェロンを産生する。5-10%の翻訳効率を仮定するとこれは非常に高い水準の発現である。最後に、翻訳効率の増加はDHFRおよびガンマー

インターフェロンに独特のものではなく、同様のベクターでヒトインターロイキン2およびヒトプロインスリンの両者も効率よく発現される。

表 1 A

A. アデノウイルス重感染を伴うトランスフェクション

プラスミド	構 造		トランスフェクション後36時間	トランスフェクション後56時間	
	VA遺伝子	リーダー	アデノウイルス感染	偽感染	
prIF-6	-	1	420	970	560
pL58	-	1-3	1,690	6,670	2,920
pQ2	+	1-3	15,200	11,550	26,320
pQ3	+	1-3	11,550	11,550	34,640

B. VA 遺伝子との共トランスフェクション

プラスミド	pSVOd	pVASVOd
prIF-6	3,850	8,770
pL58	2,230	26,320
pQ2	8,770	20,000

表 1 A の説明文

トランスフェクトしたおよびアデノウイルスで感染させたCOS細胞における γ -インターフェロン活性

A. COS細胞を表示したプラスミドDNAでトランスフェクトした。前に記載したごとく細胞を洗ってアデノウイルスで感染させるかまたは偽感染させる。アデノウイルス感染時(トランスフェクション後36時間)および感染後18時間(トランスフェクション後56時間)の時 γ -インターフェロン検定のため試料を採取する。前に記載したごとく活性を決定し単位/ $\text{ml}/10^6$ 細胞で表わす。
B. COS細胞を表示したプラスミドDNAでトランスフェクトし(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pSVOdまたはpVASVOd各々と等量で)、トランスフェクションして60時間後に γ -インターフェロン検定のため試料を採取する。

実 施 例 3

ベクターp91023(B)の構成

形質転換ベクターpAdD26SVpA(3)はKaufmanらによりMol. Cell Biol. 2(11): 1304-1319 (1982)に記載されている。それは図3に示した構造を持つ。簡単にいうとこのプラスミドはアデノウイルス2(Ad2)メジャー後期プロモーター

の転写制御下にあるマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) cDNA 遺伝子を含む。5' スプライス部位はアデノウイルス DNA に含まれており、3' スプライス部位 (γ ムノグロブリン遺伝子から誘導される) は Ad 2 メジャー後期プロモーターおよび DHFR コード配列の間に存在する。SV40 初期ポリアデニル化部位は DHFR コード配列の下流に存在する。pAdD26SVpA (3) の原核生物 - 誘導部は pSV0d からであり (Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y. および Maniatis, T. 1981, *Cell* 27: 279-288) 哺乳類細胞の複製を阻害する事が知られている pBR322 配列を含んでいない (Lusky, M. および Botchan, M. 1981, *Nature* (London) 293: 79-81)。

pAdD26SVpA (3) は図 3 に図示したごとく、プラスミド pTPL に変換する。pAdD26SVpA (3) の 2 つの BstI 部位の 1 つを欠失せしめて pAdD26SVpA (3) をプラスミド pAdD26SVpA (3)(d) に変換する。これは PstI により部分消化 (酵素活性が不十分なものをを用いること) 1 つの PstI 部位が切断さ

れた線状にされたプラスミドの亜集団が得られる) した後、Klenow で処理し、連結してプラスミドを再環化し、大腸菌を形質転換して、SV40 ポリアデニル化配列の 3' に位置する PstI 部位が欠失しているものをスクリーニングする事により達成される。

アデノウイルスの 3 つに分かれたリーダーおよびウイルス付随遺伝子 (VA 遺伝子) を図 3 に図示したごとく、pAdD26SVpA (3)(d) に挿入する。第 1 に pAdD26SVpA (3)(d) を PvuII で切断し、3 つの分かれたリーダーからなる 3 つの複製の第 1 の 3 部分で開いた直線分子となす。その後、pJAW 43 (Zain ら、1979, *Cell* 16: 851) を XhoI で消化し、Klenow で処理し、PvuII で消化し、アクリルアミドゲル上での電気泳動 (6% トリスホウ酸緩衝液中; Maniatis ら (1982) 前記文献) して第 2 のリーダーおよび第 3 のリーダーの一部を含む 138 塩基対フラグメントを単離する。138 bp フラグメントを PvuII 消化 pAdD26SVpA (3)(d) と連結する。連結生成物は、大腸菌をテトラサ

イクリン耐性に形質転換するのに使用し、コロニーは 140 塩基対フラグメントとハイブリダイズする ³²P 標識プローブを使用する Grunstein-Hogness 法を用いてスクリーニングする。陽性のハイブリダイズしたコロニーから DNA を調製し、挿入された 138 塩基対 DNA の 5' または 3' が第 2 または第 3 のアデノウイルス後期リーダーに特異的に再構成された PvuII 部位にあるかどうかを試験する。PvuII 部位の正しい方向は挿入した 138 塩基対の 5' 末端にあるものである。このプラスミドを図 3 の pTPL と称する。

SV40 DNA を AvaII で消化し、XhoI リンカーをフラグメントに連結し、XhoI で消化して XhoI 部位を開裂し、ゲル電気泳動により 4 番目に大きい D フラグメントを単離することにより、SV40 エンハンサー配列を含む SV40 の AvaII D フラグメントを得る。リンカーを付けた D フラグメントの挿入により SV40 エンハンサーの単一のダイレクト繰り返し配列を得る。これは連結において pAdD26SVpA (3) の量を XhoI リンカーを付けた D

フラグメントに比例させた結果である。pCVSVL2-TPL 中の SV40 D フラグメントの方向性は、アデノウイルスメジャー後期プロモーターのごとく SV40 後期プロモーターが同じ方向であるのと同じである。

pCVSVL2-TPL にアデノウイルス付随 (VA) 遺伝子を導入するには、第 1 にアデノウイルス 2 型 HindIII B フラグメントを含むプラスミド pBR322 を構成する。アデノウイルス 2 型 DNA を HindIII で消化しゲル電気泳動後 B フラグメントを単離する。このフラグメントは前もって HindIII で消化してある pBR322 に挿入する。大腸菌をアムピシリン低抗性に形質転換後、組換え体の HindIII B フラグメントの挿入をスクリーニングし、挿入方向に制限酵素消化により決定する。pBR322-Ad HindIII B は図 4 に描かれた方向でアデノウイルス 2 型 HindIII B フラグメントを含む。

図 4 に図示したごとく、プラスミド pBR322-Ad HindIII B から VA 遺伝子を、HpaI による

消化EcoRI リンカーの添加およびEcoRI による消化により便利に得、1.4 kb フラグメントとして回収する。EcoRI 付着末端を持つそのフラグメントはpTPL (前もつてEcoRI で消化してある) のEcoRI 部位に連結する。大腸菌 HB101 を形質転換後、テトラサイクリン耐性で選択し、コロニーはVA 遺伝子に特別なDNAプローブへのフィルターハイブリゼーションによりスクリーニングする。陽性のハイブリダイズクローンからDNAを調製し、制限酵素消化により確認する。生成プラスミドはp91023 と称する。

p91023 内の2つのEcoRI 部位を除く。p91023 はEcoRI で完全に切断し、2つのDNAフラグメントを発生させる: 1つはAdMLP, TPL, DHFR, SV40pA 部位, SV40 AvaII フラグメントおよびpBR322 Tet 遺伝子および複製起点 (複製領域のない) 約7 kb のフラグメントで他はVA 遺伝子を含む1.3 kb のフラグメントである。両方のフラグメントの末端をPolI のKlenowフラグメントで満たし、両フラグメント (即ち、1.3 kb および

7 kb) を一緒に再連結する。プラスミドp91023 (A) はp91023 同様にVA 遺伝子を含んでいるが、2つのEcoRI 部位が欠落している事が、VA 遺伝子を用いるGrunstein-Hognessスクリーニングおよび通常の制限部位分析により同定された。

p91023 (A) 内の単一のPstI 部位を除き、EcoRI 部位に置き換える (図5)。p91023 (A) をPstI で完全に切断し、PolI のKlenowフラグメントで処理して平滑末端を発生させる。EcoRI リンカーをp91023 (A) の切断したPstI 部位に連結する。線状p91023 (A) (切断PstI 部位にEcoRI リンカーが結合している) を結合していないリンカーから分離し、EcoRI で完全に消化し、再連結する。プラスミドp91023 (B) が回収され、p91023 (A) と同様の構造を持つ事が同定されるが、前のPstI 部位にEcoRI 部位が位置している。EcoRI 部位が挿入された生成物遺伝子を持つプラスミドp91023 (B) はAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland, に大腸菌内pCSF-1としてATCC 番号39754で供託されており、入手可

能である。

実施例 4

実施例2および3に記載した翻訳活性化因子 (アデノウイルスVA 遺伝子) を含むベクターの有用性を選択的にトランスフェクトした細胞および安定に形質転換した細胞の両者においてヒトアンチトロンビンIII (ATIII) をコードしたcDNAを用いて実証する。

ヒトアンチトロンビンIII cDNAのクローニング

“凝固および線維素溶解の生理的阻害剤” (D. Collen, B. Wiman および M. Verstraete 編集, Elsevier, Amsterdam, 43-54 ページ) においての T. E. Petersen, G. Dudek - Wojciechowska, L. Sottvup-Jensen, および S. Magnusson (1979) によるアミノ酸配列から推論した特定のオリゴヌクレオチドプローブへのハイブリダイゼーションによりヒト肝臓cDNAライブラリーからヒトアンチトロンビンIIIをコードした完全長cDNAを単離する。

ヒト肝臓cDNAライブラリーは常法 (Maniatis

ら) により調製する。polyA⁺mRNAをヒト肝臓から単離し、メチル水銀で処理し、第1のcDNA鎖合成は逆転写で実施した。塩基で処理後、第2鎖の合成はDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントによりなし遂げ、二重鎖cDNAは続いてS1ヌクレアーゼ、EcoRIメチラーゼおよびDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントで処理し、末端を切断する。EcoRIリンカーを加え、過剰のリンカーはEcoRI消化により除去し、CL4Bカラムを通す。cDNAを9+10に連結し、インビトロでパッケージして平板培養する (C600 hf1, Ron Davis, Stanford University から得た高頻度溶原化剤)。総計500,000を243から248のアミノ酸 (Met - Met - Tyr - Gln - Glu - Gly) および304から309のアミノ酸 (Glu - Glu - Met - Met - Leu - Val) から調製された2組のオリゴマーでスクリーンする。アミノ酸コードの変性に基づく、1組のオリゴヌクレオチドは8つの異なる17-mersからなり、他のものは16の異なる17-mersからなっている。

5 μ g/mlの変性サケ精子DNAを含む5XSSC、0.5%SDSおよび5XDenhart溶液中でハイブリダイゼーションを実施する。両方のプローブに対してハイブリダイズした38の陽性のものを単離し、ブランクを精製し、オリゴヌクレオチドプローブに再ハイブリダイゼーションして同定する。これらの実験の経過中に、S.C.Bockら(1982)(Bock, S.C., Wion, K.L., Vehar, G.A.およびLawn, R.M. *Nuc. Acids Res.*, 10, 8113-8125)によりヒトATIIIのヌクレオチド配列が発表された。従つて、完全長クローンを単離するため、イニシエーターATGを取囲む17-mersオリゴヌクレオチド(TATTCGAATGTGATAGG)を合成し、38の陽性のものとハイブリダイズした。13の陽性のうち、1つを調製し、ラムダーATIII-C3(AT3-C3)と名付け、それは約1.4 kb挿入物を含んでいる。

発現ベクターへのATIII cDNAの挿入

ATIII発現に利用する発現ベクターはpQ2(図2(c))から誘導された。pQ2をPstIで消化してインターフェロンcDNAを除き、アガロースゲル

から7.5 KBフラグメントを単離する。ATIIIのためのcDNAは内部にEcoRI部位を含まないので、EcoRI消化で切断することが可能であり、アガロースゲル電気泳動によりラムダーAT3-C3から1.4 KBフラグメントを単離する。前もつて合成アダプター:

PstI 5' GGCGAGCCTG3' EcoRI
ACGTCCGCTCGGACTTAA

をつけたベクターにEcoRI ATIIIフラグメントを挿入する。合成アダプターの付加は10-merの5'末端のみをリン酸化して達成される。この事により形質転換体のバックグラウンドを低下させる非リン酸化EcoRI末端を残す。低融点アガロースゲル電気泳動により過剰のアダプターを除去後、7.5 KBフラグメントを抽出し、EcoRI ATIII cDNAフラグメントに連結する。連結混合物を大腸菌HB101をテトラサイクリン耐性に形質転換するのに使用し、ATIII cDNAをコードするT4末端標識(Englund, P.T. (1971), *J. B. C.*, 246, 3269-3276) cDNAフラグメントを利用する

Grunstein-Hogness法(1975, *PNAS*, 72, 3961-3965)でのスクリーニングにより陽性物を同定する。2つのクローンを得た、p91023 ATIII-C3はATIII cDNAをアデノウイルスプロモーターに関して適切な方向で含有し、p91023 ATIII-E1はcDNAを反対の向きで含んでいる。プラスミドp91023 ATIII-C3(pATIII-C3)(図6)は大腸菌-HB101の株としてAmerican Type Culture Collection(Rockville, Maryland)に受付番号ATCC 39941として寄託されており、入手可能である。

p91023-ATIII-C3およびp91023-ATIII-E1は大腸菌中での生殖のためのPBR322由来複製物およびテトラサイクリン耐性遺伝子およびCOSサル細胞内での複製のためのSV40由来物およびpBR322 "毒"領域の1.1 KB欠失を持つ(Lnsky, M. および M. Botchan (1981), *Nature*, 293, 79-81)。COSサル細胞内でのcDNAの発現の活性化の要素は、アデノウイルスメジャー後期プロモーター(AdMLP; SV40 エンハンサー (SV

40 AVA IIDフラグメント); アデノウイルスの3つに分かれたリーダーのcDNAコピー; 3つに分かれたリーダーの第2のイントロンからのグスプライス部位およびマウスイノグロブリン遺伝子からのグスプライス部位からなるハイブリッドイントロン(Kaufman, R.J. および Sharp P.A. (1982) (*Mol. Cell Biol.*, 2, 1304-1319); SV40 初期領域ポリアデニル化信号; およびアデノウイルスVA遺伝子である。ヒトアンチトロンピンIIIをコードする1.4 Kb cDNAの方向を示した。p91023-ATIII-C3はATIII cDNAをAdMLPからの転写に対し適切な方向で含んでいる。

COS細胞発現

実施例1に記載したごとく、COSサル細胞内へDEAE-デキストラン開始トランスフェクションによりp91023-ATIII-C3およびp91023-ATIII-E1を導入した。トランスフェクションして24時間後、細胞を無血清Dulbecco改良Eagle培地で洗い、条件付け培地を24時後に、ウサギ抗-ヒトアンチトロンピンIII(Robert

Rosenberg, Massachusetts Institute of Technology, より得た) を用いるラジオイムノアッセイのため採取する。もしくは、トランスフェクション48時間後、細胞を ^{35}S メチオニン($1\text{mCi}/\text{ml}$)で4時間標識する。条件付け培地を採取し、実施例1に記載したごとく、免疫沈降およびSDSゲル電気泳動のため細胞抽出物を調製する。トランスフェクトしたCOS細胞条件付け培地中のATIIIの検定結果を表2に示した。

表 2

遺伝子工学による哺乳類細胞中のATIIIはラジオイムノアッセイにより検定された。

CHO 安定株	条件付け培地中のATIII
CHO-DUKX B11	.021 nM
CHO-B1-1.0neo	5.2 nM
CHO-A1-50neo	4.5 nM
COS 遷移的感染	
p91023-ATIII-E1	.018 nM
p91023-ATIII-C3	1.92 nM

カルシウム-リン酸-DNA沈殿は30分室温でインキュベートする。 5×10^5 細胞/10cm皿で前もって継代培養した(トランスフェクションの前に24時間)CHO DUKX-B1細胞の培地を除き、DNA-カルシウムリン酸沈殿を単層の細胞に添加する。室温で30分インキュベーション後、5mlの10%小牛胎児血清を含むアルファア-培地(Flow Labs)を供給し、細胞を37°で4.5時間インキュベートする。細胞の単一層から培地を除き、室温(24°)で3分間10%グリセロールを含む2mlのアルファア-培地を加え、除去後細胞を洗い10%小牛胎児血清、各々10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のチミジン、アデノシン、デオキシアデノシン、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むアルファア-培地に播種する。2日後細胞を10%透析小牛胎児血清、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含み、スクレオサイド類を欠き、1mg/mlのG418(GIBCO)を含有するアルファア-培地へ1:15で継代培養する。4-5日後細胞を同じ選択培地(スクレオサイドを欠く)に再び播種する。

ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子によるATIII cDNA 遺伝子の増幅

DHFRが欠落したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞についてはUrlaubおよびChainによりPNAS, 77, 4216-4220(1982)に記載されている。プラスミドp91023-ATIII-C3, pSV2Neo(Southern, P. および P. Berg, 1982, J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341)およびpAdD26SVpA(3)(Kaufman, R. J. および Sharp, P. A. Mol. Cell Biol., (1982), 2, 1304-1319)を一緒に混合し(25 μg p91023-ATIII-C3, 2.5 μg pSV2Neo および 2.5 μg pAdD26SVpA(3))、酢酸ナトリウム(pH 4.5)を0.3Mまでおよび2.5容量のエタノールを加えて沈殿させる。沈殿したDNAは放置して風乾し、Kaufman および Sharp らにより J. Mol. Biol., 150: 601-621(1982)に記載されているごとく2 XHEBSS(.5ml)(Chu および Sharp Gene, 13, 197-202(1981))に再懸濁し、.25M CaCl_2 (.5ml)と激しく混合する。

選択培地へ継代培養して10-12日後コロニーが現れる。

各々の皿からコロニー(約20)をプールし、pSV2Neoの選択性を保つためのG418の共存を除いてメトトレキサートの濃度を増加させて殖やす。しかしながらpSV2Neoの保持はATIII cDNA 遺伝子の増幅には必須ではない。形質転換体の最初のプールは条件付け培地のラジオイムノアッセイまたは ^{35}S -メチオニン標識および免疫沈降に続くSDD-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の両方で検定してもATIII活性を示さない。しかしながら、0.02、0.1および1.0 μM メトトレキサート含有培地における選択後はATIIIは両方の方法で観察できる(表1)。以後は希釈プレーティングでクローン株を得る。COSおよびCHO細胞で産生されたATIIIはそのトロニンへ結合する能力のため活性であり、ヘパリン存在下結合が促進される事が示された。

実施例 5

組織プラスミノゲン活性化因子(ヒト)をコードするcDNA

目的の mRNA を多量に含む他の細胞に前に使用した常法に従つて Bowesメラノーマ細胞から単離された mRNA から逆転写によりヒト tPA をコードする cDNA 遺伝子を得た。

tPA タンパク質は Bowesメラノーマ細胞株 (Rifken 博士 (New York University) より入手可能) より単離される。アミノ酸配列分析は、Bowesメラノーマ細胞からの条件付け培地に見出されたタンパク質は 2 つのはつきり異つた N 末端を含む事を示し、1 つの N 末端は他のものより 3 つ多くアミノ酸を含む。これらの 2 つの N 末端はグリシン N - 末端 (Gly-Ala-Arg-Ser-Tyr-Gln-Val-Ile-Cys-Arg-Asp-Gln-Lys-Thr-Gln-Met-Ile-Tyr-Gln-Gln-His) およびセリン N - 末端 (Ser-Tyr-Gln-Val-Ile-Cys-Arg-Asp-Gln-Lys-Thr-Gln-Met-Ile-Tyr-Gln-Gln-His) と呼ぶ。

Bowesメラノーマ細胞からメッセンジャー RNA を単離し、この分野で一般的に知られているごとく、cDNA の合成のための鋳型として使用する。

使用する (図 7 に示した)。これらのアミノ酸のいくつかは 1 つ以上の 3 個のヌクレオチドコドンでコードされるので、以下の常法によりすべての可能性にわたる 17-mer プローブをプールする。その後ライブラリー中のクローンがプローブにハイブリダイズする事が観察されるまで Grunstein および Hogness の方法で cDNA ライブラリーをスクリーンする。プライマーの上流配列を決定する部分ジデオキシ プライマー伸長 (Wallace ら, *Nuc.Acids Res.*, 9, 3647-3656 (1981)) として知られている通常の方法によりクローンが tPA の一部をコードしている事を確認する。これはクローンが tPA の N - 末端アミノ酸配列に対応するコドンを含む事を実証する。

クローン中に存在が観察された cDNA はプラスミドから単離し、放射性標識し、順次に、cDNA ライブラリー中に観察される他の重複した tPA cDNA のフラグメントを同定するプローブとして用いる。一緒に (2 重の、重複した配列は除外して) 成熟 tPA タンパク質および非翻訳 5' および 3'

cDNA をコピーし、二重鎖を産生する。この分野でよく知られている単一ポリマーでのテーリングまたは合成リンカーでテトラサイクリン低抗プラスミドベクターを導入する。クローン化したプラスミドのライブラリー (各々のクローンは Bowesメラノーマ細胞中に存在する mRNA 種の独特の cDNA コピーを含有している) をベクターで大腸菌を形質転換して調製し、抗生物質耐性大腸菌細胞を選択する。

少なくとも tPA の一部をコードする cDNA を含む cDNA ライブラリー中のプラスミドを標準的な Grunstein および Hogness スクリーニング法 (Grunstein ら, 1975, *PNAS*, 72, 3961) により同定する。この方法においては、DNA を単一鎖の型に固定し、放射性標識したプローブへのハイブリダイズまたは結合する能力をスクリーニングする。そのようなプローブとは tPA タンパク質の小さな一部のアミノ酸配列と一致する配列を持つ短い DNA オリゴヌクレオチドである。tPA の N 末端から 15-20 のアミノ酸のアミノ酸配列を

領域の部分をコードするフラグメントが同定されるまでこの過程を続ける。

2 つの異なつたライブラリーをスクリーンして一緒に tPA の完全なコード配列をおおう cDNA クローンを得た。cDNA クローン sam1 および S20 が非対称のリンカーを付けたライブラリーから単離された。このライブラリーは以下の常法 (Maniatis ら, 分子クローニング - 実験用手引書, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Harbor, N.Y (1982)) により作製した。即ち Bowes 細胞 mRNA からの cDNA を 3' 末端で EcoRI リンカーと 5' 末端で SalI リンカーと連結し、連結した cDNA を適当なベクターに挿入する。cDNA クローン Ed1 は GC - テール cDNA ライブラリー (Maniatis ら, 前記文献) から単離された。図 8 a は tPA 完全コード配列にまたがり、部分的に重複している組からなる cDNA クローン Sam1, S20 および Ed1 を図示している。

3 つのフラグメントから単一コード配列を一緒に結合するのに用いた技術を図 8b, 8c および 8d

に模式的に示した。図8bはフラグメントを受け取るのに使用し、完全なcDNA遺伝子の複製のためのプラスミドの構成を図示している。プラスミドYIp5の構成はBotsteinらによりGene, 8, 17-24 (1979)に記載されている。2u イーストプラスミドは市販品である。指示“+”はプラスミド中の制限酵素部位を示す。制限酵素および/またはDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント(以後しばしば“Klenow”と称する。)による処理は矢印の次の名称で示してある。これらの酵素は市販品である。普通の酵素反応条件を用いる。ある種の制限酵素の消化産物の連結により他の制限酵素により加水分解されないDNA配列ができる事に注意されたい。例えばYOp4プラスミドの構成ではHpaI部位が消失する。図8cおよび8dはライブラリーで同定された3つのcDNAフラグメントからの完全長cDNAクローンを含むプラスミドの構成を図示している。図8(c)においてはプラスミドYOp4をXbaIで切断し、末端をKlenowで平滑にし、直線状プラスミドは再びEcoRIで切断

する。遺伝子の5'末端を含むtPA cDNAフラグメント(非翻訳5'末端部分を含む-図7の枠で囲んだSalI部位を参照されたい)をSalIでの消化Klenow処理、およびEcoRIでの消化によりそのプラスミドから単離する。線状YOp4およびtPA cDNA 5'フラグメントSalIを連結しプラスミドI90iを形成するがその際XbaIおよびSalI部位の連結によりSalI部位が形成される。プラスミドI90iを大腸菌で連結し、アムピシリン耐性をスクリーンする。

プラスミドI90iは図8bに示したごとく処理し、tPA cDNAの3'フラグメント(EdI)(そのプラスミドの順にBgl II, KlenowおよびEcoRI処理により得る)と連結する。Bgl II部位(図7で枠で囲んで示した)をプラスミドI90iのClaI消化物への連結によりこわす。tPA cDNAのPstI-BglIIおよびEcoRI-PstI副フラグメントは捨てる、第1のものはなぜなら非コード領域であり、第2のものは第3のフラグメントS20(図8c)と重複した領域のためであり、S20により捨てた

配列が供給される。これらの工程によりプラスミドJ118を得、それは大腸菌中で複製させ、アムピシリン耐性をスクリーンする。

プラスミドJ118をEcoRIで切断し、図8cに示した中央のtPA cDNAフラグメントS20と連結する。J205中のS20フラグメントの適切な方向は、この分野で一般に知られている非対称エンドヌクレアーゼ消化により確認する。

このtPA cDNA遺伝子は前に発表されたヒトtPAの配列と、ヌクレオチドの数が異なり、図7に示したごとく一つのアミノ酸が置換されている。

実施例 6

形質転換ベクターpLDSGの構成

この実施例の出発プラスミドはpAdD26SVpA(3)(Kaufmanら、Mol.Cell Biol. 2(11):1304-1319 (1982))として知られているものである。それは図9aに記載した構造を持つ。簡単に記すと、このプラスミドはアデノウイルス2 (Ad2)メジャー後期プロモーターの転写制御下にあるマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)cDNA遺伝子

を含む。5'スプライス部位はアデノウイルスDNAに包含されており、イムノグロブリン遺伝子から誘導された5'スプライス部位はAd2メジャー後期プロモーターおよびDHFRコード配列の間に存在する。SV40初期ポリアデニル化部位はDHFRコード配列の下流に存在する。pAdD26SVpA(3)の原核生物誘導部はpSV0d (Mellon, P., Parker, V., Ginzman, Y. および Maniatis, T. 1981, Cell, 27, 279-288)からであり、哺乳類細胞の複製を阻害する事が知られているpBR322配列(Linsky, M., および Batchan, M. 1981, Nature (London), 293, 79-81)を含んでいない。

pAdD26SVpA(3)を図9aに示した第1の工程でプラスミドpCVSVL2に変換する。SV40DNAをAvaIIで消化し、そのフラグメントにXhoIリンカーを連結し、XhoIで消化してXhoI部位を開裂させ、ゲル電気泳動により4番目に大きい(D)フラグメントを単離してSV40のAvaII Dフラグメントを得る。第1の工程に示したごとくリンカーを結合したDフラグメントを挿入して、SV40エン

ハンサーの単一直接繰り返しを得る。これは連結の時 pAdD26SVpA(3)の母と Xho-I リンカー結合 D フラグメントを比例させた結果である。pCVSVL2 中の SV40D フラグメントの方向はアデノウイルス メジャー後期プロモーターの様に SV40 後期プロモーターが同じ向きになつていくとくである。

pCVSVL2 を実施例 5 からの J205 tPA 遺伝子でのスプライシングのために合致するように計画された 3 工程過程によりプラスミド pB2L2 に変換する。第 1 に、pCVSVL2 中の 2 つの PstI 部位の 1 つを PstI (ただ 1 つの PstI 部位が切断された線状プラスミドの亜集団を得る事ができるように酵素活性が低下したものをを用いる) で部分消化して欠失させ、Klenow で処理し、連結してプラスミドを再環化し、大腸菌を形質転換させ、SV40 ポリアデニル化配列の 3' に位置する PstI 部位の欠失をスクリーニングする。

第 2 に、プラスミドを BglII で消化し、Klenow で処理し、連結し、大腸菌形質転換体コロニーのイムノグロブリンイントロンの BglII 部位 (図

3a の 3' スプライス部位) が破壊されたものをスクリーニングする。

第 3 に PstI での消化、Klenow 処理、BglII リンカーの連結および過剰の (100 単位/μg DNA) BglII による消化で PstI 部位を BglII 部位に変換する。生じる線状 DNA をトリス-酢酸緩衝液中低融点アガロース (1.2%) ゲルでのゲル電気泳動により単離する。この DNA は イン ビトロ で 1 μg/ml の濃度で 24° にて連結し、大腸菌 HB101 をトランスフェクトするのに使用する (Hanaiatis らの前記文献を参照されたい)。テトラサイクリン耐性のコロニーを成長させ、DNA を調製し、BglII および PvuII 消化により DHFR cDNA の 5' 末端の BglII 部位の存在を分析し、PstI で消化する。多量の規模での DNA 調製は CsCl で 2 度 DNA をひもで縛つて実施した。

実施例 5 からの pJ205 を HindIII および SalI で消化し、Klenow で処理し、BamHI リンカーを連結した。

生成する DNA はフェノール抽出を行い、クロロ

ホルムで抽出し、酢酸ナトリウムを 0.3M (pH4.5) まで、および 2.5 容のエタノールを添加してエタノール沈殿する。遠心分離により DNA を回収し、ペレットを乾燥する。ペレットを再懸濁し、BamHI リンカーを切断するため BamHI (100 単位/DNA/μg) で消化する。消化物をアガロースゲルに応用し 2.1 kb バンドを同定する。バンドを回収し、10mM トリス HCl (pH7.4) および 1 mM EDTA を含む等量の緩衝液を加え、68° で 15 分間加熱して DNA を得る。DNA をフェノール抽出し (2X)、クロロホルム抽出して (2X)、酢酸ナトリウム (pH4.5) の 0.3M までの添加および 2.5 容のエタノールの添加によりエタノール沈殿させる。

図 9 b に図示したごとく、ベクター pB2L2 を BglII で消化し、クシアルカリホスファターゼで処理し、フェノール (2X)、クロロホルム (2X) で抽出し、0.3M までの NaOAc (pH4.5) および 2.5 容のエタノールの添加によりエタノール沈殿する。この沈殿した DNA を pJ205 からの BamHI リンカーを結合した 2.1 kb フラグメントと連結する。連結

DNA を大腸菌 HB101 の形質転換に使用する。テトラサイクリン耐性のコロニーを Grunstein-Hogness 法により tPA cDNA に特異的な ³²P 標識プローブを用いてスクリーニングする。J205 を HindIII および SalI で消化し、³²P-アルファ-dCTP を利用して T4 DNA ポリメラーゼで標識してプローブを作製する。陽性のハイブリッドクローンから DNA を調製し、HindIII、PvuII および SacI を用いる別々の制限酵素消化により tPA cDNA の存在をスクリーニングする。これらの消化により tPA cDNA の存在ばかりでなく、ベクター内のプロモーターに対する cDNA の方向もまた示される。pLDSG は適切な方向の tPA を含むプラスミドである。

実施例 7

共トランスフェクションおよび増幅

プラスミド pLDSG および pAdD26SVpA(3) (実施例 6) を一緒に混合し (50 μg pLDSG および 0.5 μg pAdD26SVpA(3))、0.3M までの NaOAc (pH4.5) および 2.5 容のエタノールの添加により沈殿せしめる。

沈殿 DNA は放置して風乾し、 $2 \times \text{HEBSS}$ (0.5 ml) (Chn および Sharp Gene, 13, 197-202 (1981)) に再懸濁し Kaufman および Sharp より J. Mol. Biol., 150, 601-621 (1982) に記載されているごとく 0.25 M CaCl_2 (0.5 ml) と激しく混合する。カルシウム-リン酸-DNA 沈殿は室温で 30 分間そのまま放置し、CHO DUKX-B1 細胞 (Chasin および Urlaub. P. N. A. S., 77, 4216-4220 (1980)) に適用する。これらの細胞の成長の保持はすでに記載されている (Kaufman および Sharp, J. Mol. Biol. 前記文献 および Chasin および Urlaub 前記文献)。

DUKX-B1 細胞はトランスフェクション 24 時間前に $5 \times 10^5 / 10 \text{ cm}$ 皿で継代培養する。培地を除き、DNA-カルシウムリン酸沈殿を単層の細胞に添加する。室温で 30 分間インキュベーション後 10% 子牛胎児血清を含むアルファア-培地 (Flow) 5 ml を加え細胞は 37° で 4.5 時間インキュベートする。培地を細胞の単一層から除き、10% グリセロール含有の 2 ml のアルファア培地 (Flow) を室温

(24°) で 3 分間添加し、除去後細胞を洗い、10% 子牛胎児血清、各々 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のチミジン、アデノシン、デオキシアデノシン、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むアルファア培地に播種する。2 日後、10% 透析子牛胎児血清、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むスクレオサイドを欠くアルファア培地に 1:15 で継代培養する。4-5 日後細胞を、再び同一の選択培地 (スクレオサイドを欠く) に播種する。

10-12 日後現れたコロニーを選択培地へ継代培養する。メトトレキセート (MTX) 選択および増幅の 2 つの図式を追いかけた。表 3 の下に示した第 1 の図式では、外来性 DNA (選択遺伝子) の取り込みに基づいて単一の独立したクローン化形質転換体を単離し、続いて各々のクローンは生成物遺伝子の発現を増加させる条件下殖やす (即ち、メトトレキセートの濃度を増加させての成長)。第 2 の図式では、外来性 DNA (選択遺伝子) の取り込みに基づいて多くの独立した形質転換体のプールを単離し、生成物遺伝子の発現を増加させる

条件下殖やす (即ちメトトレキセートの濃度を増加させての成長)。集団から個々のクローンを単離し、生成物遺伝子の発現を分析する。生成物遺伝子発現の最も高い水準を示すクローンはさらに生成物発現が増加する条件下再び成長させる (即ち、培養培地中のメトトレキセートの濃度を増加させて成長させる)。

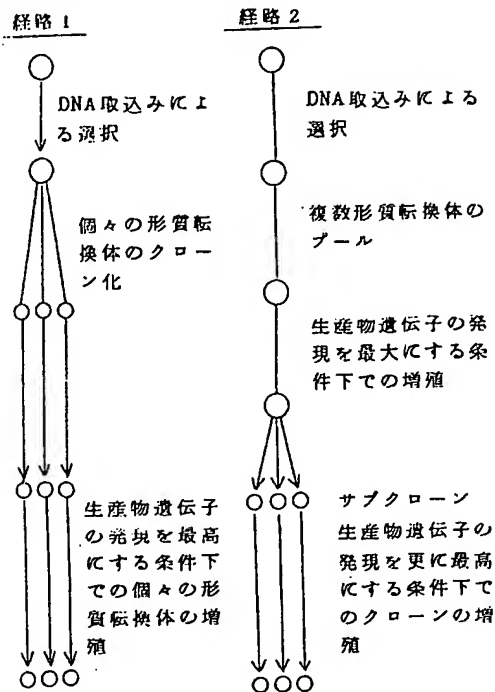
図式 1 に従った結果は表 4 に示した。スクレオサイドなしのアルファア培地で成長できる個々のクローンを選択し、殖やし、tPA 活性を検定する。活性は CTA ミリ単位/細胞/日即ち $\text{mU}/\text{細胞}/\text{日}$ で記録した。(以下を参照)。tPA 活性を示すクローンは続いて $0.02 \mu\text{M}$ MTX、 $0.1 \mu\text{M}$ MTX および $0.5 \mu\text{M}$ MTX への連続的耐性で選択した。

MTX 選択下ではクローン 4C1 は tPA 活性の増加がなかった。しかしながら、MTX 不在下 4C1 を培養して、サブクローン (H3B および B10A) を発生させるとそれらは MTX 耐性で選択した場合共増幅し、高水準の tPA を発現する。この方法を特定の仮説に制限する事は望んでおらず、これは元々

の 4C1 形質転換体からの兄弟 DNA 中の tPA に連結していない DHFR 遺伝子の分離のせいであると考えられる。tPA 遺伝子に連結した単一の DHFR 遺伝子を含むサブクローンは MTX 選択によりこれらのクローンと一緒に DHFR および tPA 遺伝子を増幅する。

表 3

製品の発現を最高にするための経路



を選択した。元のプールされた形質転換体は、0, 0.02 および 0.5 μM MTX を含む培地中でのカルチャーについて、それぞれ 0.03, 0.9 および 1.9 mU/細胞/日の tPA 活性を得たが、集団内の個々のクローンは表 5 に示す量で tPA を発現した。個々のクローンは 0.2 mU/細胞/日から 10 mU/細胞/日の範囲の 5.0 倍で tPA 発現レベルが変わった。この経路は大量 tPA 活性を発現するクローンを速かに同定するために好しい。経路 1 は経路 2 と組合せてより増殖性の形質転換体を作ることができることは明らかであろう。

表 4

NTX 耐性によって選択されたクローンにおける tPA 活性 (mU/細胞/日)

クローン	MTX 濃度 (μM)			
	0	0.02	0.1	0.5
1E2	0.2	0.015	0.005	0.005
4D2	0.015	0.0015	0.003	0.002
2D5	0.01	0.04	0.04	0.025
4C1	0.04	0.03	0.35	0.03

4C1 サブクローン				
	0	0.02	0.1	0.5
H3B	0.09	0.26	1.0	-
B10A	0.025	0.09	0.19	-
H8B	0.02	0.045	0.035	-
H12B	0.05	0.15	0.065	-
D8B	0.08	0.095	-	-

経路 2 による結果は表 5 に示す。ヌクレオシドを含まない培地中での選択による継代培養で得られた約 300 のコロニーを持つプールが調製された (選択プレートからのコロニー)。これらの形質転換体は 0.02 μM MTX および 0.05 μM MTX に対するセクエンシャル耐性によってこれら形質転換体

表 5

		tPA 活性 mU/細胞/日
ヌクレオシドを含まないアルファ 培地中での増殖による 300 形質 転換体の選択		0.03
↓		
0.02 μM MTX 中での増殖により 選択された細胞		0.9
↓		
0.05 μM MTX 中での増殖により 選択された細胞		1.9
↓		
0.05 μM MTX 中のクローン		
#		
3		4.25
4		7.0
5		1.6
9		3.5
12		6.25
13		1.55
16		0.2
18		0.3
20		10.0

tPA 発現のモニター

tPAをモニターする tPA の存在についての感受性検定はフィブリンの存在下でのプラスミノーゲンのプラスミンへの転化を触媒した。プラスミンは、プラスチックプレートに固定されている ^{125}I -フィブリンからの ^{125}I -フィブリンフラグメントの放出により検出される (Strickland 等, J. Biol. Chem. 251 5694-5702 (1976) か、または色素産性基質の分解によつて検出される (Drapier 等, Biochemie 61, 403-471 (1979)。好適な色素産性基質 (S2251 と称される) は Kabi (Diagnostics, Inc. Greenwich, CT) から得られる。これらの検定は当業者には良く知られており、上記 Astrup 等および上記 Drapier 等に言及されている。tPA 活性は無血清培地 5 ml で細胞を有するプレート (4×10^5 細胞 / 10cm プレート) をゆすぎ、次いで無血清培地 4 ml を加えることによつて測定された。細胞を 37°C で 20 時間インキュベートし、調質培地中のサンプルを検定用に取出した。活性の測定は mU/細胞/日の

単位で表わした。このような条件下での検定で、Bowes メラノーマ細胞ラインは 0.02 mU/細胞/日を生産した。ヒト tPA の比活性は 100,000 ユニット/μg であった。 ^{125}I -フィブリンまたは S2251 の分解速度はプラスミノーゲンからプラスミンへの転化を触媒した tPA 量に直接相関する。tPA 発現の欠損している細胞からの調質培地のサンプルはこれらの検定には無視し得るバックグラウンドしか生じない。この無視し得るバックグラウンドは活性化されたフィブリンではないプロテアーゼによるものである。何故ならば、色素産性基質検定におけるバックグラウンドは、フィブリンの除去によつても標準検定から変化しないためである。これに反して、tPA 産性 CHO 細胞ラインからの活性は Bowes メラノーマ tPA によつて示されるのと極めて似ているフィブリン活性化を示す。tPA 活性の定量はウロキナーゼを用いる標準曲線と比較することによつて得られる (Leo Pharmaceuticals, ベルギー)。活性の単位 (CTA; 血栓溶解剤委員会) はウロキナーゼの WHO 標準サンプルと比較す

ることにより定義されている。

tPA の合成は、単増の細胞 (2×10^6 / 10 cm) を 5 ml のメチオニンを含まない培地で 2 度洗浄し、1 mCi ^{35}S メチオニンを含み通常のメチオニンを含まない培地 1 ml を添加することによりモニターされる。細胞を 37°C で 4 時間インキュベートし、調質培地を免疫吸着剤としてスタフイロコツカス アウレウスを用い、うさぎの抗-ヒト tPA と免疫沈殿させることにより検定した。

コロニー H3B から分泌された標識化された全ての蛋白をゲル電気泳動して得られる結果によれば、ヌクレオチドを含まない培地中で増殖された元の H3B サブコロニーと 0.1 μM MTX 中の増殖に関して選択された H3B 細胞との間における分泌蛋白の唯一の大きな差異は 67,000 グルトンに泳動する強力なバンドの存在である。このバンドはうさぎの抗-ヒト tPA 抗体と特異的に免疫沈殿し、かつ Bowes メラノーマ細胞ラインから同様に調製された tPA と共泳動する。これらの結果は、0.1 μM

MTX に耐性を持つ H3B クロンの選択時に、ヒト tPA の発現が 10 倍増加することを示している。

実施例 8

隣接リントベクターの造成

この実施例は tPA の停止コドンに DHFR の開始コドンと直接に結合させた形質転換ベクターの造成を説明するものである。これは実施例 6 で造成された pLDSG から tPA 3' および DHFR 5' 非翻訳領域を除去するものである。本実施例は M13 ファージテンプレートから DNA 合成をプライミングするための DNA オリゴヌクレオチドの使用に基いている (Wallace 等, [Science] 209: 1396 (1980)、Zoller 等 [Method in Enzymology Vol. 100: 468-509]。第 10 図を参照のこと。

pLDSG は BamHI で分解され、4.5 kb フラグメントをゲル電気泳動によつて単離した。この領域は pLDSG の非 pBR322 領域の大部分を含んでいる。ファージ M13 mp8 を BamHI で分解する。次いで、直線化されたファージを pLDSG の 4.5 kb フラグメントと結合し、M13 造成物を宿主菌 (JM103) の形

質転換に用いる。tPA遺伝子と融合する³²Pで標識したプローブを用いるBenton-Davisの「Science」196(1980)の方法によりブラークをスクリーニングする。正に融合するクローンを増殖し、複製型DNAを作製する。tPA遺伝子の正しい方向は制限エンドヌクレアーゼによる分解(BamHI, EcoRI および PvuII)を用いる公知の技術で決定することができる。

フージ DNAは、正しい方向を示すブラークから単離される。この一本鎖 DNAは除去されるべきフージの領域を架橋する合成プライマーと共に使用できる。プライマーの機能は5'および3'の除去領域であるDNAに融合させるものであり、これによつて位相がくるつて望ましくないDNAをループ化し、このようなDNAが後のプライマー延長工程においてテンプレートとして作用することを防止する。第10図において、プライマーの5'および3'末端およびM13-LDSGにおける対応位置はそれぞれBおよびAと命名する。

プライマーは化学合成によつて作られ、DHFR-

3'のアミノ末端におけるtPA遺伝子-TAA-ATG-これに続く9個の翻訳されたヌクレオチドの5'-末端の9個の翻訳されたヌクレオチドから成る。フージ DNAおよびプライマーを混合し、プライマーはT4 DNA リガーゼおよびDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントによつて延ばされる。これは上記Wallace等およびZoller等の文献に一般的に説明されている。生成物はJM103を形質転換するのに用いられる。ブラークからの複製型フージ DNAは³²P-標識化プライマーに融合され、Sangerによつて望ましくない領域を除去したジデオキシヌクレオチド配列として確認されており(Sanger等Proc.Natl.Acad.Sci.74 pp5463-5467(1977))。これはBamHIで分解され、かつtPA遺伝子含有フラグメントを電気泳動で単離する。このフラグメントはゲルから分離され、前記のBamHI分解で得たpLDSGの2.5kb BamHIフラグメントと結合される。結合生成物はE Coli HB101の形質転換に用いられ、テトラサイクリン耐性クローンを同定し、プラスミド

DNAを作り、かつ特定する。2.5 kb および 4.5 kb フラグメントの方向が正しいプラスミドをpLDSGIとして同定する。

このプラスミドはpLDSGおよびpAdD26SVpA(3)の代わりに、実施例7におけるリンクトベクターとして使用できる。

実施例 9

pLDSGはBamHIで分解され、第10図に示されるように4.5 kb フラグメンが単離される。BamHI分解による2.5 kb フラグメントと共に、実質上、全てのpBR322領域が除かれる。pAdD26SVpA(3)も同様に分解される。tPAおよびDHFR遺伝子含有フラグメントはpLDSGおよびpAdD26SVpA(3)について実施例7に示すようにCHO細胞を形質転換するのに用いられる。

実施例 10

アデノウイルストリパータイトリダーおよびVA遺伝子を含むベクター

本実施例の方法は第11図に説明されている。アデノウイルストリパータイトリダーを含むベクターを造成するために、pB2L2から出発し、こ

れをPvuIIで開裂して直線状分子を作成する。次いで、pJAW43(Zain等「Cell」16,851(1979))をXhoIで分解し、Klenowで処理し、PvuIIで分解し、更に138塩基対フラグメントをアクリルアミドによる電気泳動(トリス硼酸塩バッファー中6%; Maniatis等(1982))で単離する。138 bpフラグメントを次いでPvuIIで分解pB2L2に結合する。結合生成物をE Coliをテトラサイクリン耐性に形質転換するのに用いられ、³²Pで標識化され、140塩基対フラグメントに対して融合するプローブを用いGrunstein-Hogness法でスクリーニングする。正に融合するコロニーからDNAを作成し、再生されたPvuIIサイトが第2および第3アデノウイルス後リーダーに特異的に挿入された138塩基対DNAの5'であるかまたは3'であるかを試験する。PvuIIサイトの正しい方向では、138塩基対は5'側に挿入されるであろう。このプラスミドはpB2L2-TPLと命名する。

アデノウイルス関連(VA)遺伝子をpB2L2-TPLに挿入するために、アデノウイルスタイプ2

DNA第1をHindIIIで分解する。公知の方法によるゲル電気泳動の後、Eフラグメントを単離する。このフラグメントをKlenowで処理し、HpaIで分解し、EcoRI リンカーに結合させ(協同的)、EcoRIで分解し、そして1.3kbバンドをアガロースゲルから分離する。このフラグメントを予じめEcoRIで分解したpB2L2-TPLのEcoRIサイトに結合する。E Coli HB101の形質転換およびテトラサイクリン耐性による選択後、VA遺伝子に特異的なDNAプローブに対するフィルター融合によりコロニーをスクリーニングする。正に融合するクローンからDNAを作成し、制限エンドスクレアーゼ分解により特定する。生成プラスミドはpB2L2-TPLVで分解される。これは実施例6のpB2L2に代えて好適に使用され、修飾pLDSGを生成し、この生成物は実施例7の方法におけるpAdD26SVpA(3)と共に使用される。

実施例 11

免疫グロブリンエンハンサーを含むベクターの造成

ベクター pSer は記述されている (Gillies 等、

存在によつて Grunstein-Hogness 法によりスクリーニングする。このプローブは J205 を Hind III および Sal I で分解し、 ^{32}P - α -dCTP および放射性同位元素を含まない dTTP、dATP および dGTP の存在下でこの DNA に T4 DNA ポリメラーゼにより標識化することにより作ることができる。正に交雑するクローンは増殖され、プラスミドは回収される。第12a図はこのベクター (p7B1) を説明している。この DNA は、プロトプラスト融合の Sandri-Goldin 法の変法である前記 Gillies 等に説明されているようなミエローマ細胞 J558L 中に導入される。プロトプラストの融合 36 時間後、細胞を 5 mg/ml のミコフエノール酸、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のキサンチンおよび 15 mg/ml のヒポキサンチンを含む培地中で増殖され、プラスミド DNA を取込んだ細胞を選択した。この方法で単離した1つのクローンは tPA を 0.05 mU/細胞/日の割合で発現した。他の適当な親細胞は ATCC CRL1580 または他の非分泌性ミエローマ細胞株である。

「Cell」33:717-728 (1983) これは SV40 エンハンサーが除去されている pSV2GPT の誘導体である (PvuII から SphI、塩基対 64~270)。Mulligan 等、「Science」209:1422-1427 (1980) を参照されたい。この DNA は、細胞がキサンチンおよびヒポキサンチンの存在下で増殖される場合、ミコフエノール酸に対する耐性をコード化している。マウス免疫グロブリンの不変部から誘導された免疫グロブリンエンハンサーを含む 1 kb フラグメントを pSer の EcoRI サイトに挿入し、pSerx2/3 を誘導した。

このベクターは 1 個の BamHI サイトを持つ。これを BamHI で分解し、塩基性ホスホターゼで処理し、次いで pLDSG のフラグメントに結合する。このフラグメントは実施例 8 に示すように、BamHI による分解および大きな (4.5 kb) フラグメントの分離によつて作られる。結合された DNA はアンピシリン耐性によつて選択される E coli HB101 を形質転換するのに使用され、コロニーは ^{32}P 標識化 tPA プローブに対する交雑による tPA 遺伝子の

実施例 12

転写的に活性化されたベクターの造成

転移活性転写性アクトベーター E1A を、アデノウイルス初期領域 2 プロモーターを含むベクターと共に使用する。

pCVSVL は Kanfman 等「Mol. Cell. Biol」2(11) 1304-1319 (1982) に開示されている。pCVSVL を BalI で分解し、Klenow で処理し、XhoI リンカー(共働的)に結合し、XhoI で分解し、EcoRI で分解し、ゲル電気泳動により 4.2 kb フラグメントを単離する。

アデノウイルス 2 DNA を EcoRI で分解し、EcoRI F フラグメント (マップユニット 70.7~75.9) を回収する。F フラグメントを XhoI で分解し、かつ E2 プロモーターサブフラグメントをゲル電気泳動で単離した。このサブフラグメントは EcoRI および XhoI 粘着末端を有し、上記で得られた pCVSVL の 4.2 kb フラグメントの EcoRI および XhoI 末端に結合される。得られるプラスミドは細菌を形質転換するのに使用される。標識化

E2 プローブに交雑するクローンは pE2-7 として回収される。pE2-7 はアデノウイルス初期領域プロモーターを利用する DHFR cDNA 遺伝子である。pE2-7 の造成は R. Kingston および P. Sharp の方法によつて与えられる。Mol. Cell Biol., Vol. 4, pp1970-1977 (1984) を参照のこと。

pE2-7 は PstI で部分分解され、Klenow で処理され、BglII リンカーに結合され、BglII で分解される。これによつて、pJ 205 (第 9 b 図) がらの tPA 遺伝子を常法により pE2-7 に挿入できる。

tPA 遺伝子を持つ pJ 205 の一部を第 9 b 図に示すように pJ 205 から切除し、BamHI 粘着末端を pE2-7 の BglII 接着末端に結合し、第 12 (b) 図に示すプラスミド pE2-7PA を得る。pE2-7PA はアデノウイルス初期領域 2 プロモーターを利用する tPA 遺伝子である。E1A 遺伝子およびプロモーターはアデノウイルス 2 の KpnI フラグメント (10~5.8 マップユニット) として得られる。

な変化は 1.2 mU / 細胞 / 日以上を生産するクローン (例えば、クローン 9、12 および 20) においても明らかである。これらの細胞は組織培養皿に付着せず、したがつてより高い水準の tPA 発現による選択は困難である。これはアプロチニン (シグマ) を培地に添加 (0.5~5% V/V) することにより、またはプラスミノゼンを含まない胎児牛血清を用いることによつて克服された。これらの処理の結果は、高水準の tPA を生産する細胞に負荷された毒性を軽減することである。無プラスミノゼン血清は Deutsch アンド Mertz [Science] (1970) p1095 に説明されるように血清をリジン-セファロース 4 B (ファルマシア社製) のカラムに通過させることによつて得られる。

実施例 14

COS 細胞における EPO の発現

エリスロポエチン (EPO) 遺伝子を含むクローンを遺伝子工学的手法によりヒト胎児肝臓ライブラリーから作成した。ラムダー HEPOFL13 を命名する EPO クローンは第 13 図に示すスクレオチド配

pE2-7PA, pE2-7 および E1A 遺伝子ベクターは 20:1:4 のモル比で使用され実施例 7 に更に開示されているように CHO 細胞を形質転換する。このように単離された形質転換体により tPA 活性が 0.008 mU / 細胞 / 日生産される。E1A 遺伝子を省略して得られる形質転換体 (20:1 の比率で pE2-7 を持つ pE2-7PA) では僅かに 0.0003 mU / 細胞 / 日を発現する。

実施例 13

tPA 発現の増加に関連する細胞形態学における変化

tPA 合成の最適条件下での増殖および選択により、組織培養皿に付着できない形態の異なった細胞が得られる。低水準の tPA (0.01 mU / 細胞 / 日) を生産する無スクレオチド培地 (実施例 7、表 4 に説明されているようなもの) 中で増殖された 300 個の形質転換体のプールでは平らな形態上の特徴を持つ CHO 細胞である。0.05 μM 以下の MTX 中での増殖について表 4 に説明したような選択を行った場合、tPA の水準は 0.6 mU / 細胞 / 日に増加し、形態上の変化は明らかになった。このよう

列およびアミノ酸配列を持つ。クローンラムダー HEPOFL13 は p91023 (B) ベクターに挿入され、当業者には公知の遺伝子工学的手法を用いて COS-1 細胞に感染させた。精製プラスミド DNA のそれぞれ 8 μg を用いて DEAE-デキストラン法により 5×10^6 COS-1 細胞に感染させた (Sompayrac 等, [Proc. Natl. Acad. Sci.] 78: 7575-7578 (1981) および Luthman 等 [Nuc. Acids Res.] 11: 1295-1308 (1983))。12 時間後、細胞を洗浄し、クロロキン - (0.1 mM) で 2 時間、37 °C 処理し、再度洗浄し、10% 胎児牛血清 10% を含む 10 ml の培地に 24 時間曝した。この培地を 4 ml の無血清培地に換え、48 時間後に回収した。

免疫活性 EPO (α) の生産を Sherwood および Goldwasser (Blood, 54: 885-893 (1979)) に説明されているようなラジオイムノアッセイによつて定量し、300 ng/ml であることが判明した。

ラムダー HEPOFL13 を含む p91023 (B) ベクターも、クロロキン処理無しで COS-1 細胞に感染さ

せ、前記と同様に増殖させた。EPOのインビトロ生物活性は、CFU-Eの供給源であるマウスの胎児肝臓細胞によるコロニー形成検定によるか、またはフェニルヒドラジン注射マウスからの脾細胞を用いる ^3H -チミジン取込み検定によつて測定され、それぞれ2 U/m、および3 U/mlの値を得た。また、EPOのインビトロ生物活性は、低酸素マウス法または絶食ラット法を用いて測定し、それぞれ、1 (CFU-E) および2 (^3H -Thy) U/mlの値を得た。

実施例 15

CHO細胞におけるEPOの発現

(ベクターPK1-4の造成)

マウスのジヒドロ葉酸還元酵素に隣接するSV40初期領域プロモータ、SV40エンハンサー、小量抗原イントロンおよびSV40ポリアデニル配列を含むプラスミドpSV2DHFR (Subramani 等, 「Mol Cell Biol」 1: 854-864 (1981) からのBamHI-PvuIIフラグメント (フラグメントA) を単離した。残りのフラグメントは以下のよう

にファイリング反応で平滑化した。以下のようにつくられるSV40エンハンサーを含む340bp HindIII-EcoRIフラグメントを上記のDNAに結合した。

複製のSV40オリジンを含むSV40からのHindIII-PvuIIフラグメントをプラスミド π lacに挿入した (Little 等, Mol Biol Med, 1: 473-488 (1983))。この π lacベクターは、BamHIで π lac DNAを分解し、DNAポリメラーゼIの大フラグメントで接合末端をフィリインし、このDNAをHindIIIで分解することにより作製された。得られたプラスミド(π SVHPlac)はPvuII平滑末端に結合することによつてBamHIサイトを再生した。EcoRI-HindIIIフラグメントをSVHPlacから作り、複製のプラスミドオリジンを含むPSVod (上記Mellon等) のEcoRI-HindIIIフラグメントに結合し、得られたプラスミドpSVHPodを選択した。SV40オリジン/エンハンサーを含むPSVHPodの340bp EcoRI-HindIIIフラグメントを作り、DNAポリメラーゼIの大フラグメントでその両末端を平滑にした。HindIII-EcoRI

ベクターp91023(A)から得た。p91023(A)をアデノウイルスプロモーター付近の単一PstIサイトにおいてPstI分解してプラスミドを直線化し、次いで合成PstI-EcoRIコンバーターに結合し、再閉環 (元のPstIサイトにPstI-EcoRIサイトを作る: 91023(B)) するか、またはDNAポリメラーゼIの大フラグメントで処理してPstIサイトを消去し、合成EcoRIリンカーに結合し、再閉環 (元のPstIサイトにEcoRIサイトを作る: 91023(C)) した。p91023(C)由来のフラグメントAとフラグメントp91023(B)とを結合して、2つの新しいプラスミドを作った。これらのプラスミドはEcoRI-PstIサイトかまたはPstI-EcoRIサイトのいずれかを元のPstIサイトに持つていた。PstIサイトがアデノウイルス主後期プロモーターに最も近いPstI-EcoRIサイトを含むプラスミドをp91023(C)と名付けた。

ベクターp91023(C)をXhoIで完全に分解し、接合末端を持つ得られた直線化DNAを、DNAポリメラーゼIのE coliの大フラグメントによる末

フラグメントの方向は、そのフラグメント内のBamHIサイトがVA遺伝子に最も近いようになっているプラスミド (p91023(CO)/Xho/平滑化+EcoRI/HindIII/平滑化SV40オリジン+エンハンサー) をpES105と命名した。プラスミドpES105をBamHIおよびPvuIIで、およびPvuII単独で分解し、アデノウイルス主後期プロモーターを含むBamHI-PvuIIフラグメント (フラグメントB)、および耐性遺伝子 (テトラサイクリン耐性) を持つプラスミドおよびその他のDNA配列を有するPvuIIフラグメント (フラグメントC) を単離した。フラグメントA、BおよびCを結合し、第14図に示された得られたプラスミドを単離し、RK1-4と命名した。プラスミドRK1-4は米国メリーランド州、ロックビルのATCCにATCC 439940として寄託された。

EPOの発現

クローンラムダHEPOFL13からのDNAをEcoRIで分解し、EPO遺伝子を含む小RIフラグメントをプラスミドRK1-4のEcoRIサイトにサ

ブクローンした。このDNA(RKFL13)はDHFR-欠損CHO細胞を直接に(分解することなく)感染させるのに使用され、以下のように選択、拡大された。2日間の増殖の後、少くとも1つのDHFR遺伝子を取込んだ細胞はヌクレオシドを含まず、10%透析胎児牛血清を補充したアルファー培地中で選択した。選択培地中での2週間の増殖の後、コロニーを元のプレートから除き、各プール10-100コロニーのグループ中にプールし、再プレートし、ヌクレオシドを含まないアルファー培地中に全面増殖した。メトトレキゼート選択の前に増殖されたプールからの培地上清をRIAによりEPOに関して検定した。陽性のEPO生産を示したプールは直ちにサブクローンし、再検定し、更に陽性のものは段階的選択(以下参画)を行つた。RIAにより陰性であるプールに関して、メトトレキゼート(methotrexate, 0.2 μ m)の存在において増殖された対応する培養物から得たメトトレキゼート耐性コロニーはRIAによりプール中EPOについて検定した。陽性であつたこれらの培養物をサ

ブクローンし、更にメトトレキゼートの濃度を増加して増殖させた。

段階的メトトレキゼート(MTX)選択を、濃度を増したMTXの存在下に細胞を培養する繰返しサイクルによつて行つた。各段階において、EPOを、RIAにより、およびインビトロ生物活性により培養上清について測定した。各段階の濃度増加に使用されるMTXは0.2 μ M, 0.1 μ Mおよび0.5 μ Mであつた。

RKFL13DNAはマイクロインジェクションによりCHO細胞内に挿入された。得られたFPO発現の程度は表6に示す。

表 6

サンプル	検定	培地中に放出されたEPO水準	
		α -培地 回収	0.02 μ M MTX 含有 α -培地回収
コロニープールA	RIA	3 ng/ml	42 ng/ml(プール) 150 ng/ml(クローン)
	3H-Thy	-	15 U/ml
単一コロニークローン (0.2C-Z)	RIA	-	90 ng/ml
	3H-Thy	-	5.9 U/mg
マイクロインジェクテ ッドプール(DEPO-1)	RIA	60 ng/ml	160 ng/ml
	3H-Thy	1.8 U/ml	-

本発明は好ましい態様を含み詳細に説明した。しかしながら、これらの開示を検討することにより当業者は、本発明の範囲内で変更および改良を行うことができることが理解されるであろう。

4. [図面の簡単な説明]

第1a図はプラスミドpAdD26SVpA(3)の構造を説明するものである。

第1b図はプラスミドpCVSVLの構造を説明す

るものである。

第1c図はプラスミドpD20の構造を説明するものである。

第1d図はプラスミドpD17の構造を説明するものである。

第1e図はプラスミドpD61の構造を説明するものである。

第2a図はプラスミドpIFD-6の構造を説明するものである。

第2b図はプラスミドpL58の構造を説明するものである。

第2c図はプラスミドpQ2の構造を説明するものである。

第2d図はプラスミドpQ3の構造を説明するものである。

第3図はプラスミドpAdD26SVpA(3)からプラスミドpTPLの造成を図解説明するものである。

第4図はプラスミドpTPLからプラスミドp91023の造成を第3図に引続いて図解説明するものである。

第5図は第4図に続く図解図であり、p91023からプラスミドp91023(図)の造成を説明するものである。

第6図はp91023-ATIIIを図解説明するものである。

第7図はヒト組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)およびその非コード化フランキング領域のヌクレオチド配列を示すものである。

第8a図はエンテールtPA蛋白配列をコードする4個の重なり合うcDNAクローンを説明する図である。

第8b~8d図はヒトtPAの複製型cDNAを得るための適当な方法を図解的に表わす図である。

第9a~9b図はtPA形質転換ベクターを作る方法を図解的に示す図である。

第10図はリンクされたベクターを作るための方法を図解的に示す図である。

第11図は翻訳アクチベーターを含む共形質転換ベクターを作るための方法を図解的に示す図である。

第12a図は真核生物のエンハンサーを含む形質

転換用ベクターの図解図である。

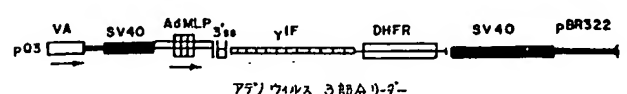
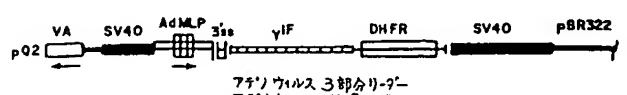
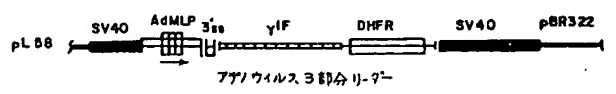
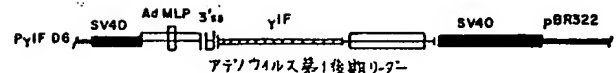
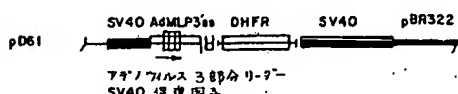
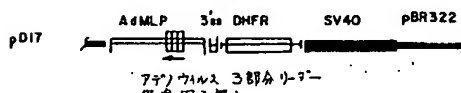
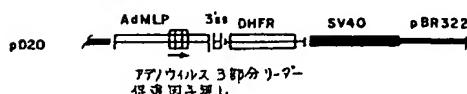
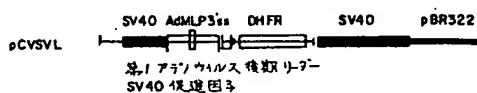
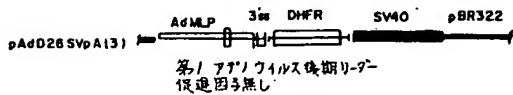
第12b図はトランス-アクティング転写アクチベーターに感受性の領域を含む形質転換用ベクターの図解図である。

第13図は、EPOクローンラマダーHEPOFL13のヌクレオチド配列およびそれから生じるアミノ酸配列を示す。

第14図は形質転換用ベクターpRK1-4を説明する図解図である。

代理人 井理士 謝 浅 恭 三
(外5名)

図面の浄書(内容に変更なし)



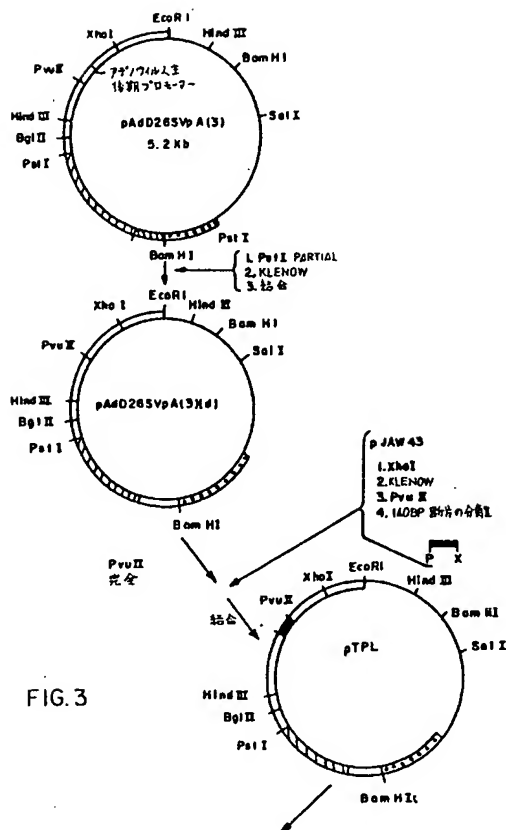


FIG. 3

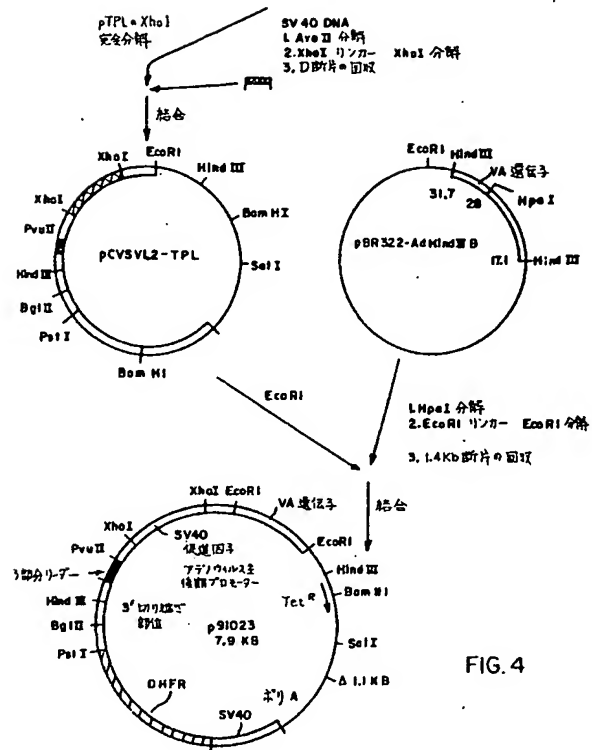


FIG. 4

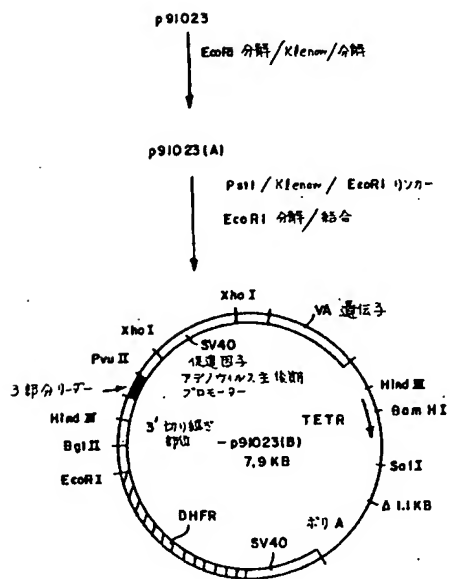


FIG. 5

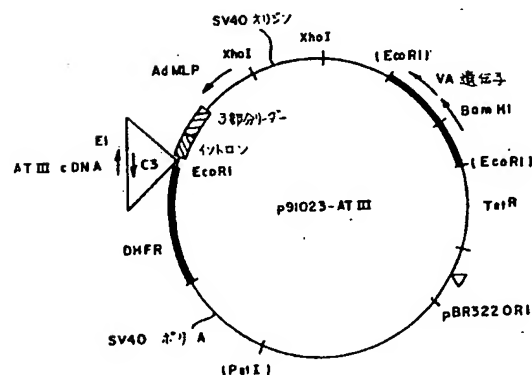


FIG. 6

Sall
 GTCGACCGGCAGGGGTGTGGGAGCTCAGAGCTGAGATCCTACAGGAGTCCAGGGCTGGAGAGAAAACCTCTGCCAGGAAAGGGAAGCAGCAAGCCGTCAA

						MET	Asp	Ala	MET	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys
TTTAAGGACGCTGTGAAGCAATC	ATG	GAT	GCA	ATG	AAC	AGA	GGG	CTC	TGC	TGT	GTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	TGT	
Gly	Ala	Val	Phe	Val	Ser	Pro	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	Arg	Phe	Arg	Arg	Gly	Ala	Arg	
GGA	GCA	GTC	TTC	GTT	TCG	CCC	AGC	CAG	GAA	ATC	CAT	GCC	CGA	TTC	AGA	AGA	GGA	GCC	AGA	
Ser	Tyr	Gln	Val	Ile	Cys	Arg	Asp	Glu	Lys	Thr	Gln	MET	Ile	Tyr	Gln	Gln	His	Gln	Ser	
TCT	TAC	CAA	CTG	ATC	TGC	ACA	GAT	GAA	AAA	ACG	CAG	ATG	ATA	TAC	CAG	CAA	CAT	CAG	TCA	
Trp	Leu	Arg	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Asn	Arg	Val	Glu	Tyr	Cys	Trp	Cys	Asn	Ser	Gly	Arg	
TGG	CTG	CGC	CCT	GTG	CTC	AGA	AGC	AAC	CGG	GTG	GAA	TAT	TGC	TGG	TGC	AAC	AGT	GCG	AGG	
Ala	Gln	Cys	His	Ser	Val	Pro	Val	Lys	Ser	Cys	Ser	Glu	Pro	Arg	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	
GCA	CAG	TGC	CAC	TCA	GTG	CCT	GTG	AAA	AGT	TGC	AGC	GAG	CCA	AGG	TGT	TTC	ACC	GGG	GGC	
Thr	Cys	Gln	Gln	Ala	Leu	Tyr	Phe	Ser	Asp	Phe	Val	Cys	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe	Ala	
ACC	TGC	CAG	CAG	GCC	CTG	TAC	TTC	TCA	ATC	TTC	GTG	TGC	GAG	TGC	CCC	GAA	GGA	TTT	GCT	
Gly	Lys	Cys	Cys	Glu	Ile	Asp	Thr	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr	Glu	Asp	Gln	Gly	Ile	Ser	Tyr	
GGC	AAG	TGC	TGT	GAA	ATA	GAT	ACC	AGG	GCC	ACC	TGC	TAC	GAG	GAC	CAG	GGC	ATC	AGC	TAC	
Arg	Gly	Thr	Trp	Ser	Thr	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Cys	Thr	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Ala	
ACG	GCC	ACG	TGC	AGC	ACA	GCG	GAG	ACT	GGC	GCC	GAG	TGC	ACC	AAC	TGG	AAC	AGC	AGC	GCG	
Leu	Ala	Gln	Lys	Pro	Tyr	Ser	Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Arg	Leu	Gly	Leu	Gly	Asn	
TTG	GCC	CAG	AAG	CCC	TAC	AGC	GGG	CGG	AGG	CCA	GAT	GCC	ATC	AGG	CTG	GGC	CTG	GGC	AAC	
His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Arg	Asp	Ser	Lys	Pro	Trp	Cys	Tyr	Val	Phe	Lys	Ala	
CAC	AAC	TAC	TGC	AGA	AAC	CCA	GAT	CGA	GAC	TCA	AAG	CCC	TGC	TGC	TAC	GTG	TTT	AAG	GCG	
Gly	Lys	Tyr	Ser	Ser	Glu	Phe	Cys	Ser	Thr	Pro	Ala	Cys	Ser	Glu	Gly	Asn	Ser	Asp	Cys	
GGG	AAG	TAC	AGC	TCA	GAG	TTC	TGC	AGC	ACC	CCT	GCC	TGC	TCT	GAG	GGA	AAC	AGT	GAC	TGC	

FIG.7A

Tyr	Phe	Gly	Asn	Gly	Ser	Ala	Tyr	Arg	Gly	Thr	His	Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Ala	Ser
TAC	TTT	GGG	AAT	GGG	TCA	GCC	TAC	CGT	GGC	ACC	CAC	AGC	CTC	ACC	GAG	TCG	GGT	GCC	TCC
Cys	Leu	Pro	Trp	Asn	Ser	MET	Ile	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Thr	Ala	Gln	Asn	Pro	Ser
TGC	CTC	CCG	TGC	AAT	TCC	ATG	ATC	CTG	ATA	GGC	AAG	GTT	TAC	ACA	GCA	CAG	AAC	CCC	AGT
Ala	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Ala	Lys
GCC	CAG	GCA	CTG	GGC	CTG	GGC	AAA	CAT	AAT	TAC	TGC	CGG	AAT	CCT	GAT	GGG	GAT	GCC	AAG
Pro	Trp	Cys	His	MET	Leu	Lys	Asn	Arg	Arg	Leu	Thr	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Ser
CCC	TGC	TGC	CAC	ATG	CTG	AAG	AAC	CGC	AGG	CTG	ACG	TGC	GAG	TAC	TGT	GAT	CTG	CCC	TCC
Cys	Ser	Thr	Cys	Gly	Leu	Arg	Gln	Tyr	Ser	Gln	Pro	Gln	Phe	Arg	Ile	Lys	Gly	Gly	Leu
TGC	TCC	ACC	TGC	GGC	CTG	AGA	CAG	TAC	AGC	CAG	CCT	CAG	TTT	CGC	ATC	AAA	GGA	GCG	CTC
Phe	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	His	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Ile	Phe	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Ser
TTC	GCC	GAC	ATC	GCC	TCC	CAC	CCC	TGG	CAG	GCT	GCC	ATC	TTT	GCC	AAG	CAC	AGG	AGG	TCC
Pro	Gly	Glu	Arg	Phe	Leu	Cys	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Cys	Trp	Ile	Leu	Ser	Ala
CCC	GGA	CAG	CGG	TTC	CTG	TGC	GGG	GGC	ATA	CTC	ATC	AGC	TCC	TGC	TGG	ATT	CTC	TCT	GCC
Ala	His	Cys	Phe	Gln	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	His	His	Leu	Thr	Val	Ile	Leu	Gly	Arg	Thr
GCC	CAC	TGC	TTC	CAG	GAG	AGG	TTT	CCG	CCC	CAC	CAC	CTG	ACG	GTG	ATC	TTG	GGC	AGA	ACA
Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Gln	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His
TAC	CGG	GTG	GTG	CCT	GGC	GAG	GAG	GAG	CAG	AAA	TTT	GAA	GTC	CAA	AAA	TAC	ATT	GTG	CAT
Lys	Glu	Phe	Asp	Asp	Asp	Thr	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp
AAG	GAA	TTC	GAT	GAT	GAC	ACT	TAC	GAC	AAT	GAC	ATT	GCG	CTG	CTG	CAG	CTG	AAA	TCG	GAT
Ser	Ser	Arg	Cys	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg	Thr	Val	Cys	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp
TCG	TCC	CGC	TGT	GCC	CAG	GAG	AGC	AGC	CTG	GTC	CGC	ACT	GTG	TGC	CTT	CCC	CCG	GCG	GAC

FIG.7B

Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Gly	Lys	His	Glu	Ala	Leu
CTG	CAG	CTG	CCG	GAC	TGG	ACG	GAG	TGT	GAG	CTC	TCC	GGC	TAC	GGC	AAG	CAT	GAG	GCC	TTG
Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	His	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg
TCT	CCT	TTC	TAT	TCG	GAG	CGG	CTG	AAG	GAG	GCT	CAT	GTC	AGA	CTG	TAC	CCA	TCC	AGC	CGC
Cys	Thr	Ser	Gln	His	Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Asn	MET	Leu	Cys	Ala	Gly	Asp
TGC	ACA	TCA	CAA	CAT	TTA	CTT	AAC	AGA	ACA	GTC	ACC	GAC	AAC	ATG	CTG	TGT	GCT	GGA	GAC
Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	His	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly
ACT	CGG	AGC	GGC	GGG	CCC	CAG	GCA	AAC	TTG	CAC	GAC	GCC	TGC	CAG	GGC	GAT	TCG	GGA	GGC
Pro	Leu	Val	Cys	Leu	Asn	Asp	Gly	Arg	MET	Thr	Leu	Val	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly	Leu
CCC	CTG	GTG	TGT	CTG	AAC	GAT	GGC	CGC	ATG	ACT	TTG	GTG	GGC	ATC	ATC	AGC	TCG	GGC	CTG
Gly	Cys	Gly	Gln	Lys	Asp	Val	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp
GGC	TGT	GGA	CAG	AAG	GAT	GTC	CCG	GGT	GTG	TAC	ACC	AAG	GTT	ACC	AAC	TAC	CTA	GAC	TGG
Ile	Arg	Asp	Asn	MET	Arg	Pro													
ATT	CGT	GAC	AAC	ATG	CGA	CCG	TGA	CCAGGAACACCCGACTCCTCAA	AAGCAAATGAGATCCCGCCTCTTCTCTT	CAGAAGACA									
TACTTCCCATTITTGGAAGTTTTCAGGACTTGCTCTGATTTCAGGATACTCTGTCTCAGATGGGAAGACATGAATGCACACTAGCCTCTCCAGGAATGCCCTCC																			
TCCCTGGGCAGAAAGTGGCCATGCCACCCTGTTTTCAGCTAAAGCCCCAACCTCCTGACCTGTCAACCGTGAGCAGCTTTGGAAACAGGACCACAAAAATGA																			
AAGCATGTCTCAATACTATAAAGATAACAAGAGATCTTTTCAGGAAAGACGGATTGCATTAGAAAATAGACAGTATATTTATAGTCACAAAGAGCCCGAGCAGCG																			
GCTCAAAGTTGGGGCAGGCTGGCTGGCGTCATGTTCTCTCAAAGCACCTTGACGTCAGTCTCCTTCCCTTTCCCACTCCCTGGCTCTCAGAAGGTAT																			
TCCTTTTGTGTACAGTGTGTAAAGTGTAAATCCTTTTTCTTTATAAACTTTAGAGTAGCATGAGAGAATTGTATCATTTGAACAACTAGGCTTCAGCATAT																			
TTATAGCAATCCATGTTAGTTTTTACTTTCTGTGGCCACAACCCGTGTTTTACTGTACTTAATAAAATTCAGATATATTTTTTCACAGTTTTTCCAAAAAA																			
AAAAAAAAI																			

FIG. 7C.

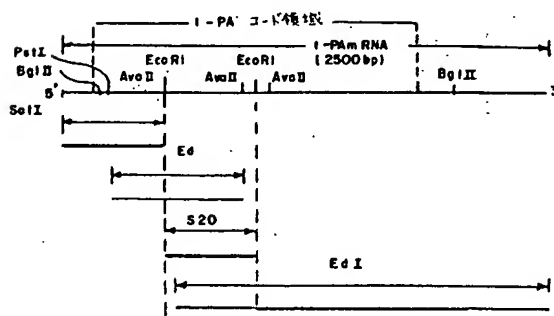


FIG. 8a

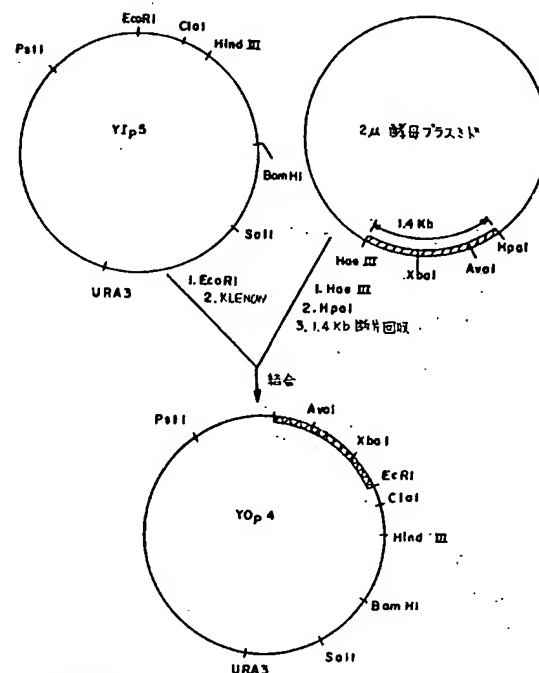
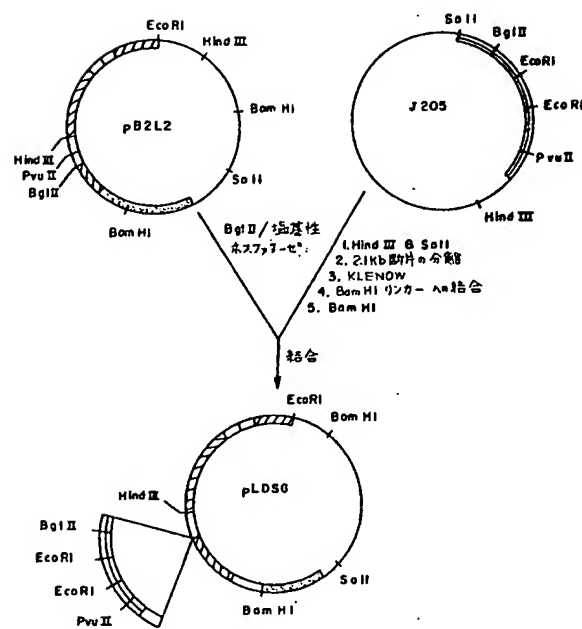
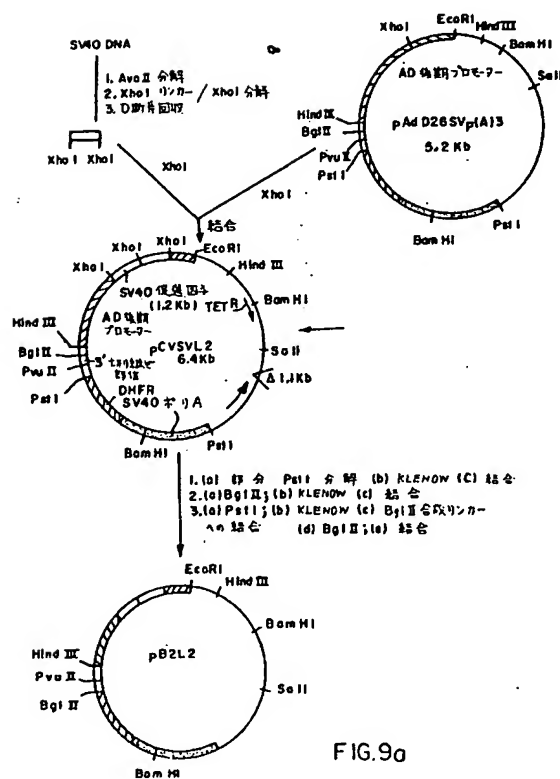
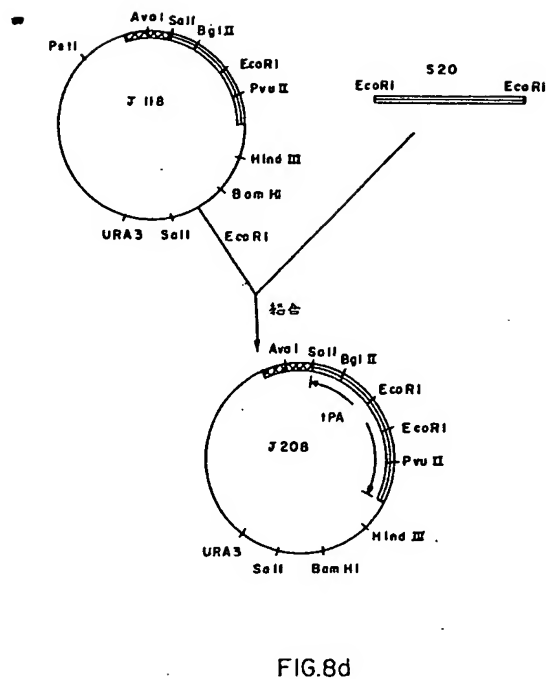
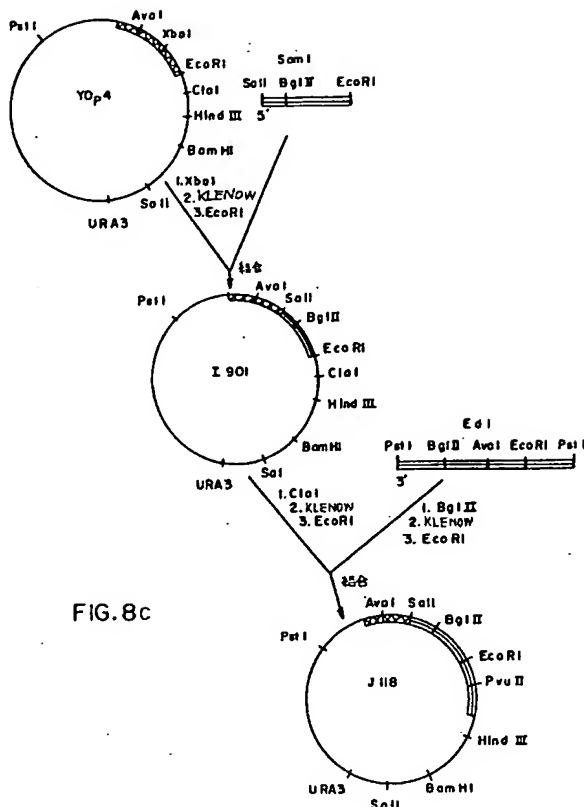
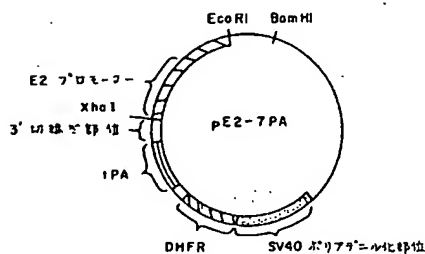
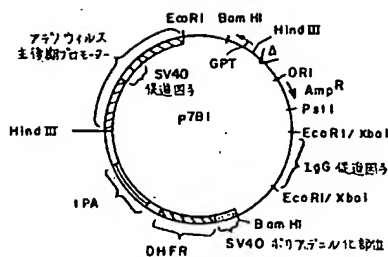
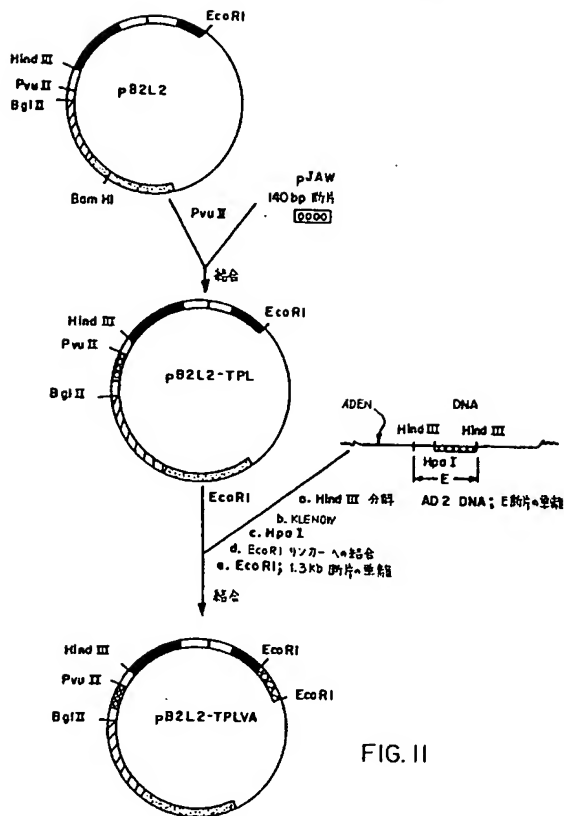
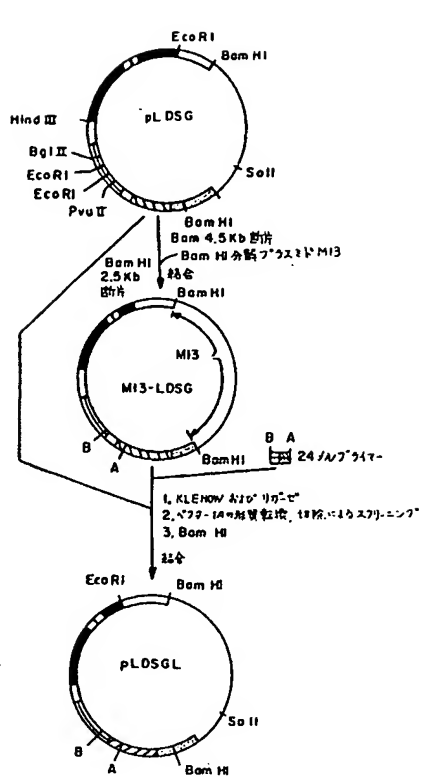


FIG. 8b





```

ccccggagcc gaccggggc caccggccc gctcgtctccg acaccgctcc
ccctggagcg cgcctctctc cccagggccc ggggggctgg cctgcaccc cgggatgggg cccccggctc
-27
ggtaccacgg cgcgcctcag gtcgctggag gaccggggcc aggcggagc atg ggg val his glu cys pro
ala trp leu trp leu leu leu ser leu pro leu leu val leu pro leu leu leu leu
ggt tgc ctg tgc ctg ctg tgc tgc ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctg
1 10 20
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
ggt cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca
SH 30 40
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
cag gcc gag aat atc acc acc acc acc acc acc acc acc acc acc acc acc acc acc
50 60
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Val Gly Gln Gln Ala
gtc cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca
70 80
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
gta gaa gtc tgc tgc cag gcc ctg gcc ctg ctg tgc gaa gct gtc ctg ccc cag gcc ctg
90 100
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
ttg gtc aac tct tcc cag tcc tgc cag gcc ctg cag ctg cat gtc gat aac gcc gtc agt
110 120
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
ggc ctt gcc acc ctg acc act ctg ctg ctt ccc cct ctg gga gcc cag aag gaa gcc atc tcc
130 140
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys
cct cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca cca
150 160
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
ctc ttc cca gtc tgc tcc aat ttc ctg ccc gca aag ctg aag ctg ttc ttc gcc ggc gcc
SH 166
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
TGC AGG ACA GGG GAC AGA TGA ccagggt gtcacctg ggcataacca ccaactccct caccacatt
gcttgcca cactctccc cgcactctt gaccctctc gaggggctct cagctcagcg ccgctctgtc
ccatggacac tccagtcca gcaatgacat ctcaggggcc agnagaactg tccaggagac anctctgga
tctaaggatg tcacaggccc aacttgagg cccaggagcg gnnatctca gggggcagct ttaactcay
ggacagagcc atgctggaa gacgctggg ctcactcggc nccctgaaa atctgagcc aggaactct
tggggagcga ttacctgtt ttcgacctc ccatcgggga caggatgacc tggggaactt agtggcag
ctgtgacttc tccaggcttc accggcatgg gcatctcttc ggtggcanga gccctctga caccggggctg
gtgggacca tgaagacagg atgggggctg gctcttgct ctcagggggt ccaagtttgg tgtattcttc
acctctatg acagagactg aaacaccna aaaaaaaaaa

```

FIG.13

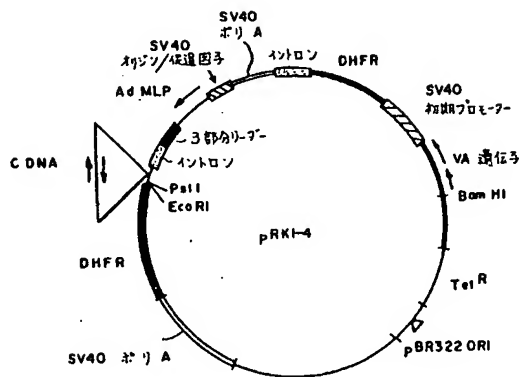


FIG.14

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号
//(C 12 N 5/00		7115-4B
C 12 R 1:91)		6760-4B
(C 12 N 9/64		7421-4B
C 12 R 1:91)		6760-4B
(C 12 P 21/02		7235-4B
C 12 R 1:91)		6760-4B

手 続 補 正 書

昭和60年7月~~14~~⁵日

特許庁長官 志 賀 学 殿 

1. 事件の表示

昭和59年特許願第 281862号

2. 発明の名称

真核細胞の形質転換のための補助DNAを含むベクター

3. 補正をする者


事件との関係 特許出願人

住 所

名称 ジェネティックス・インスチテュート・
インコーポレーテッド

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手ビル206号室(電話 270-6641-6)

氏 名 (2770) 弁理士 湯 浅 恭 三 

5. 補正の対象

タイプした明細書

図 面



6. 補正の内容

別紙の通り(尚、内容に変更なし)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.